

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 8 月 18 日 (18.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/075414 A1

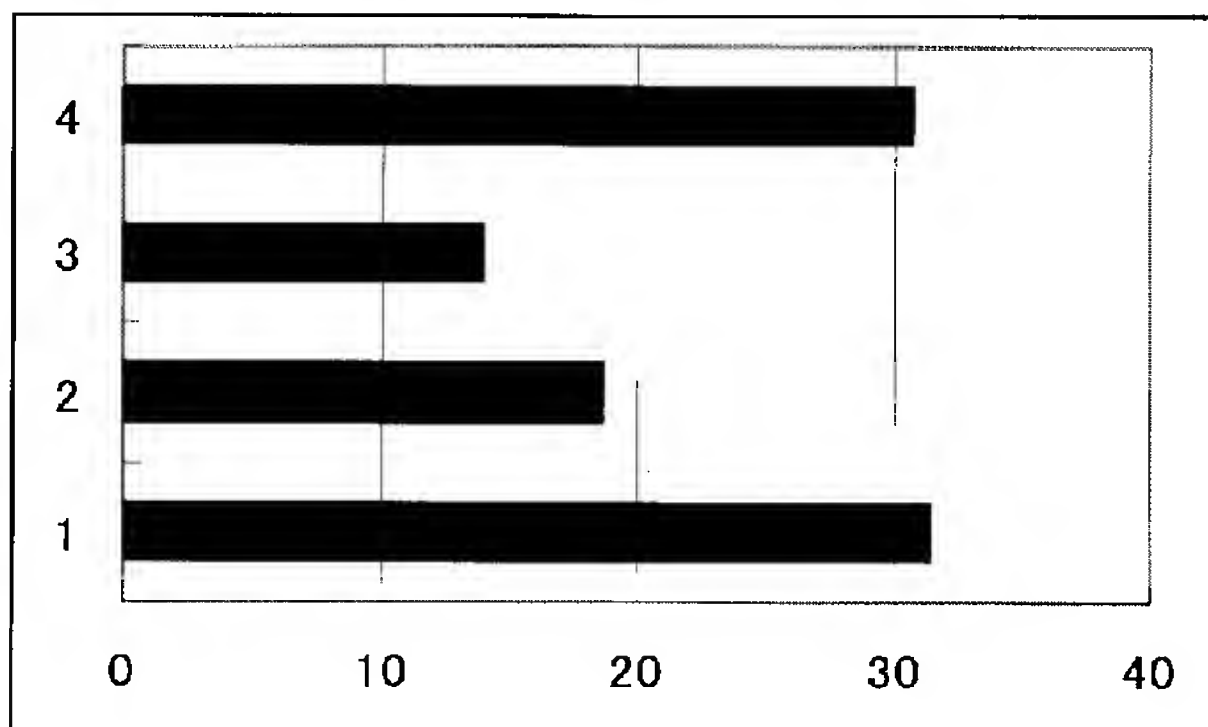
- (51) 国際特許分類⁷: C07C 279/14, A61K 31/198, 45/00, A61P 19/02, 29/00, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001574
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 3 日 (03.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-028467 2004 年 2 月 4 日 (04.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 公立大学法人横浜市立大学 (YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 2 2 番 2 号 Kanagawa (JP).

- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤 衛 (SATO, Mamoru) [JP/JP]; 〒2380111 神奈川県三浦市初声町下宮田 8 2 1 メイプル一番館 2 0 2 Kanagawa (JP). 清水 敏之 (SHIMIZU, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒2360017 神奈川県横浜市金沢区西柴 2-3 1 A-2 0 3 Kanagawa (JP). 橋本 博 (HASHIMOTO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒2300062 神奈川県横浜市鶴見区豊岡町 3 8-2 6 コーポシルビア 5 2 0 8 号 Kanagawa (JP). 山田 道之 (YAMADA, Michiyuki) [JP/JP]; 〒2360045 神奈川県横浜市金沢区釜利谷南 1-3 E-4 1 6 Kanagawa (JP). 日高雄二 (HIDAKA, Yuji) [JP/JP]; 〒5670023 大阪府茨木市西河原 2 丁目 2 1 番 3 9 号 ヴィラソレイユ 3 0 5 Osaka (JP).

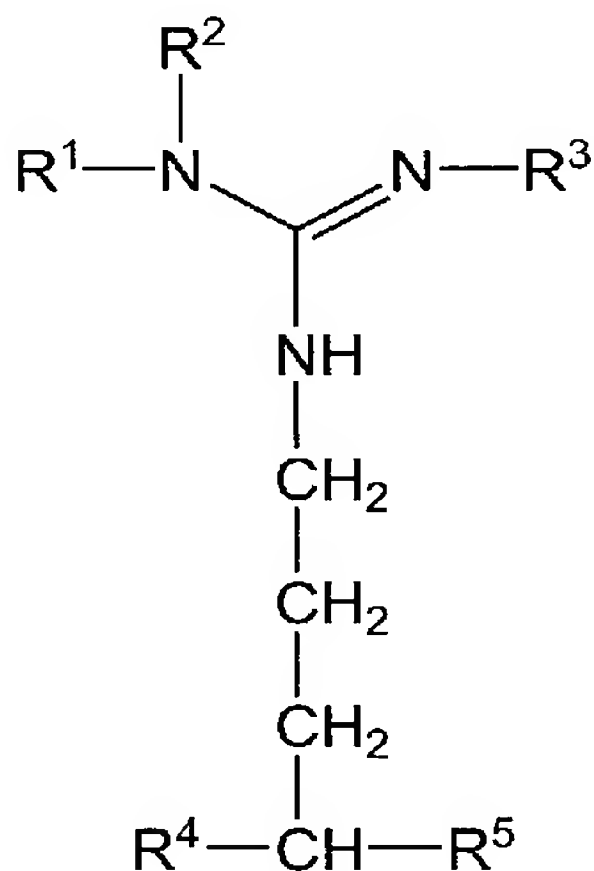
[続葉有]

(54) Title: PEPTIDYL ARGININE DEIMINASE TYPE IV INHIBITOR

(54) 発明の名称: ペプチジルアルギニンデイミナーゼ 4 阻害剤



(57) Abstract: A compound represented by the following general formula (I) or a salt thereof. [Chemical formula 1] (I) (In the formula, R¹, R², and R³ each independently represents hydrogen or C₁₋₃ alkyl, provided that at least one of R¹, R², and R³ is not hydrogen; R⁴ represents substituted amino; and R⁵ represents optionally substituted carboxy.) Also provided is a peptidyl arginine deiminase type IV inhibitor. With this inhibitor, diseases in which a peptidyl arginine deiminase participates (e.g., articular rheumatism and multiple sclerosis) can be prevented and/or treated.



(I)

[続葉有]

WO 2005/075414 A1



(74) 代理人: 間山 世津子, 外(MAYAMA, Setsuko et al.);
〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町 3 丁目
30 番の 1 農機会展 4 階 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,

SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

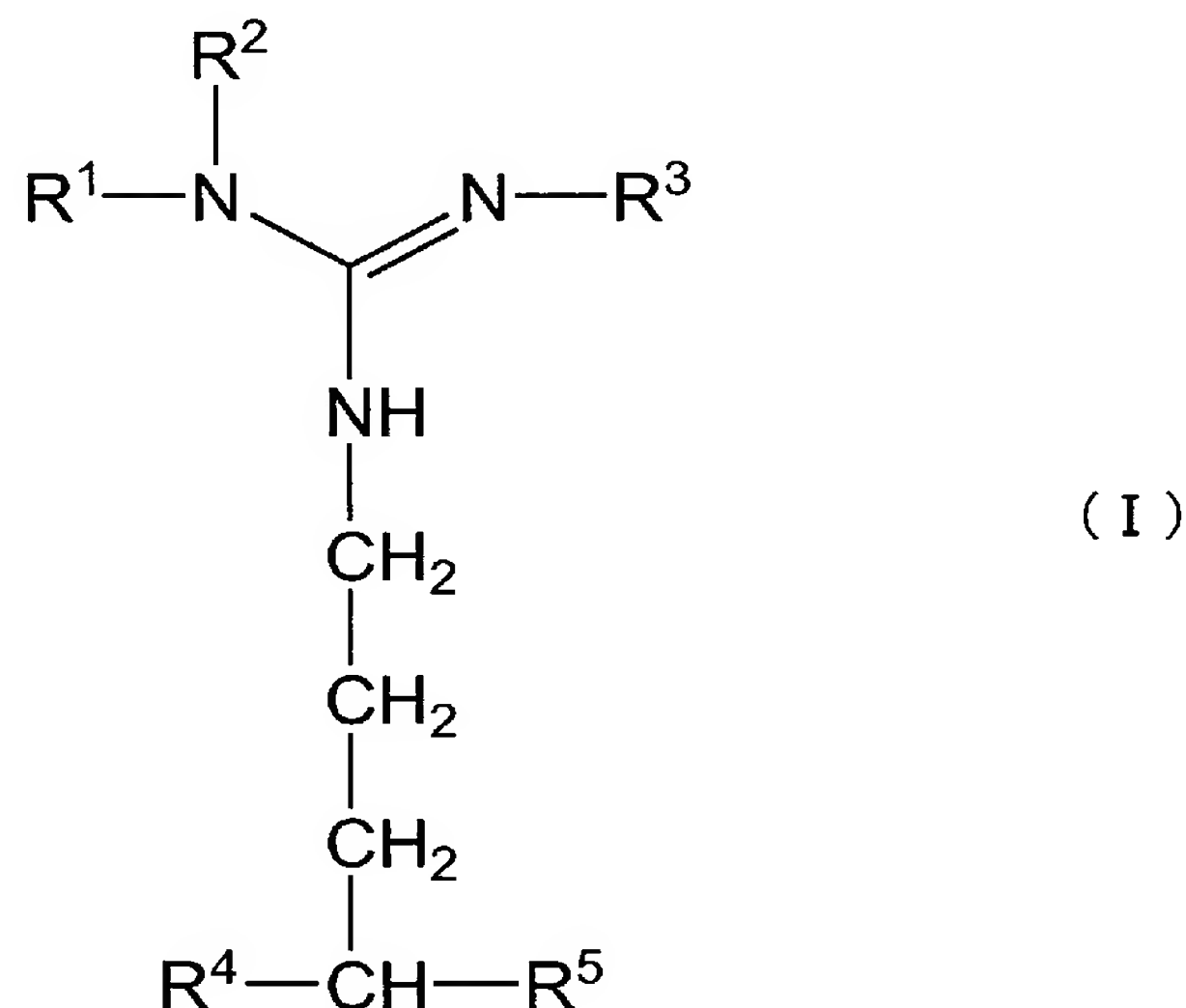
- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

【解決手段】 下記の一般式(I)で表される化合物またはその塩。

【化1】



(式中、 R^1 、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、水素原子または炭素数1〜3のアルキル基であるが、ただし、 R^1 、 R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つは水素原子ではなく、 R^4 は置換基を有するアミノ基であり、 R^5 は置換基を有してもよいカルボキシル基である)

また、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤も提供される。この阻害剤を利用することにより、ペプチジルアルギニンデイミナーゼが関与する疾患(例えば、関節リウマチ、多発性硬化症など)を予防および／または治療することができる。

明 細 書

ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤に関する。

背景技術

[0002] ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)は動物の組織に広く分布しているタンパク質修飾酵素で、カルシウムイオン依存的に(すなわち、カルシウムイオン存在下で)タンパク質中のアルギニン残基を脱イミノ化してシトルリン残基に変換する反応を触媒する。タンパク質の脱イミノ化はタンパク質分子内の正電荷の分布を変化させるので、立体構造が変化してタンパク質の生理機能に多大な影響を与える。

[0003] PADはげっ歯類において最初にその存在が確認され、その組織中に3種類のPADが存在していることが明らかにされた(非特許文献1, 2, 3, 4)。その後、中島らは、ヒト骨髓性白血病HL-60細胞をレチノイン酸やDMSOや1,25-dihydroxyvitamin D3で処理して顆粒球に分化させた細胞においてPADの活性を検出し、そのcDNAをクローニングして解析した(非特許文献5)。その結果、そのcDNAは2238bpから成り、663アミノ酸残基をコードしていること、および、すでに知られていたヒトのPADのアミノ酸配列と50-55%程度一致していることなどが明らかにされ、ヒトHL-60細胞のPADをPAD4と命名した(当初はPAD Vと命名されたが、後にPAD4と改名された)。その後、PAD4はヒト抹消血顆粒球でも発現が確認された(非特許文献6)。

[0004] これまでに、ヒトではPADはタイプ1, 2, 3, 4, 6の5種類のアイソフォームが同定されている(非特許文献7,8,9,10,11,12,13,14,25,26)。PAD1は皮膚の分化に(非特許文献15,16,17)、PAD2はミエリン塩基性タンパク質の脱イミノ化に(非特許文献18,19)、そしてPAD3は毛嚢のケラチン化に関与している(非特許文献14,20,21)。ヒトHL-60細胞やヒト末端梢血に存在するPAD4(旧名:ペプチジルアルギニンデイミナーゼV、PAD V)は、カルシウムイオンフォア処理し細胞内のカルシウム濃度を上昇させると、ヌクレオフォスミンB/23やヒストンH2A, H3, H4を脱イミノ化する(非特許文献22,23)。また、PAD4は⁵⁶PPAKKKST⁶³という核移行シグナルを持っているので、4種類のアイソフォ

ームのPAD中で唯一核内に局在している。このようなことから、PAD4はカルシウムイオン依存的にクロマチンに作用して核の機能を制御する新規のヒストン修飾酵素と考えられている(非特許文献23)。また、ヒトPADのアイソフォーム間のアミノ酸配列を比較すると、C末端の3分の2の領域のホモロジーが高いことから、C末端の3分の2の領域の構造はPADのアイソフォーム間で共通であり、この領域に活性部位があると考えられる。さらに、最近になってPAD4遺伝子の一塩基多型(SNPs)がmRNAの分解を減少させて過剰のシトルリン残基を産出し、リウマチ性関節炎の発病者の血液中にこのシトルリン化されたタンパク質に対する自己抗体ができることが報告され、PAD4がリウマチ性関節炎に深く関与していることが示されている(非特許文献24)。

[0005] 非特許文献1:Lamensa, J. W. and Moscarello, M. A. (1993) J. Neurochem., 61, 987-996

非特許文献2:Kubilus, J. and Baden, H. P. (1983) Purification and properties of a brain enzyme which deiminates proteins. Biochim. Biophys. Acta, 745, 285-291

非特許文献3:Kubilus, J. and Baden, H. P. (1983) Purification and properties of a brain enzyme which deiminates proteins. Biochim. Biophys. Acta, 745, 285-291

非特許文献4:Terakawa, H., Takahara, H. and Sugawara, K. (1991) Three types of mouse peptidylarginine deiminase: characterization and tissue distribution. J. Biochem. (Tokyo) 110, 661-666

非特許文献5:Nakashima, K., Hagiwara, T., Ishigami, A., Nagata, S., Asaga, H., Kuramoto, M., Senshu, T. and Yamada, M. (1999) Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and 1α ,25-dihydroxyvitamin D₃. J. Biol. Chem., 274, 27786-27792

非特許文献6:Asaga, H., Nakashima, K. Senshu, T., Ishigami, A. and Yamada, M. (2001) Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. J. Leukocyte Biol., 70, 46-51

非特許文献7:Watanabe, K. and Senshu, T. (1989) J. Biol. Chem., 264, 15255-15260

非特許文献8:Tsuchida, M., Takahara, H., Minami, N., Arai, T., Kobayashi, Y.,

Tsujimoto, H., Fukazawa, C. and Sugawara, K. (1993) *Eur. J. Biochem.*, 215, 677–685

非特許文献9:Nishijyo, T., Kawada, A., Kanno, T., Shiraiwa, M. and Takahara, H. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* 121, 868–875

非特許文献10:Yamakoshi, A., Ono, H., Nishijyo, T., Shiraiwa, M. and Takahara, H. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1386, 227–232

非特許文献11:Ishigami, A., Kuramoto, M., Yamada, M., Watanabe, K. and Senshu, T. (1998) *FEBS Lett.*, 433, 113–118

非特許文献12:Rus' d, A. A., Ikejiri, Y., Ono, H., Yonekawa, T., Shiraiwa, M., Kawada, A. and Takahara, H. (1999) *Eur. J. Biochem.*, 259, 660–669

非特許文献13:Nakashima, K., Hagiwara, T., Ishigami, A., Nagata, S., Asaga, H., Kuramoto, M., Senshu, T. and Yamada, M. (1999) Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and 1α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Biol. Chem.*, 274, 27786–27792

非特許文献14:Kanno, T., Kawada, A., Yamanouchi, J., Yosida-Noro, C., Yoshiki, A., Shiraiwa, M., Kusakabe, M., Manabe, M., Tezuka, T. and Takahara, H. (2000) *J. Invest. Dermatol.*, 115, 813–823

非特許文献15:Senshu, T., Akiyama, K., Kan, S., Asaga, H., Ishigami, A. and Manabe, M. (1995) *J. Invest. Dermatol.*, 105, 163–169

非特許文献16:Senshu, T., Akiyama, K., Ishigami, A. and Nomura, K. (1999) *J. Dermatol. Sci.*, 21, 113–126

非特許文献17:Ishida-Yamamoto, A., Senshu, T., Eady, R. A., Takahashi, H., Shimizu, H., Akiyama, M. and Iizuka, H. (2002) *J. Invest. Dermatol.*, 118, 282–287

非特許文献18:Pritzker LB, Nguyen TA, Moscarello MA. (1997) The developmental expression and activity of peptidylarginine deiminase in the mouse. *Neurosci Lett.* 266, 161–164

非特許文献19:Moscarello MA, Pritzker L, Mastronardi FG, Wood DD.

Peptidylarginine deiminase: a candidate factor in demyelinating disease. *J*

Neurochem. 81, 335–43

非特許文献20:Rogers, G., Winter, B., McLaughlan, C., Powell, B. and Nesci, T. (1997) J. Invest. Dermatol., 108, 700–707

非特許文献21:Ohsawa, T., Ishigami, A., Akiyama, K. and Asaga, H. (2001) Biomed. Res., 22, 91–97
Pritzker, L. B., Nguyen, T. A. and Moscarello, M. A. (1999) Neurosci. Lett., 266, 161–164

非特許文献22:Hagiwara, T., Nakashima, K., Hirano, H., Senshu, T. and Yamada, M. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 290, 979–983

非特許文献23:Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. (2002) Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. J. Biol. Chem., 277, 49562–49568

非特許文献24:Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhiko, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama–Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., Ohtsuki, M., Furukawa, H., Yoshino, S., Yukioka, M., Tohma, S., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Nishioka, Y., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y. and Yamamoto, K. (2003) Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nature Genetics, 34, 395–402

非特許文献25:Wright, P.W. et al. (2003) ePAD, an oocyte and early embryo–abundant peptidylarginine deiminase–like protein that localizes to egg cytoplasmic sheets. Dev Biol. 256, 74–89

非特許文献26:Chavanas, S. et al. (2004) Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non–coding segments and a new human gene, PADI6. Gene 330, 19–27

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、PAD4の酵素活性を阻害する新たな物質をデザインし、リウマチ性関節炎に対する新薬を開発することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、カルシウム非存在下でのPAD4(以下、 Ca^{2+} -free PAD4と記すこともある。)の立体構造と、活性残基の1つであるCys645をAlaに置換して不活性化した変異体(C645A)にカルシウムイオンを結合させたもの(以下、 Ca^{2+} -bound PAD4(C645A)と記すこともある。)及び、活性残基の1つであるCys645をAlaに置換して不活性化した変異体(C645A)にカルシウムイオンと基質(benzoyl-L-arginine amide: BA, benzoyl-L-arginine ethylester:BAEE, benzyl-glycyl-L-arginine:BGA, KQTARKSTGG:H3 peptide 1, KAPRKQLATK:H3 peptide 2及び SGRGKGGKGL:H4 peptide)を結合させた複合体(以下、それぞれ、 Ca^{2+} -bound PAD4 (C645A)-BA complex, Ca^{2+} -bound PAD4 (C645A)-BAEE complex, Ca^{2+} -bound PAD4 (C645A)-BGA complex, Ca^{2+} -bound PAD4 (C645A)-H3 peptide 1 complex, Ca^{2+} -bound PAD4 (C645A)-H3 peptide 2 complex, Ca^{2+} -bound PAD4 (C645A)-H4 peptide complexと記すこともある。)の立体構造をX線結晶構造解析法によってそれぞれ分解能2.80オングストローム、2.60オングストローム、2.30オングストローム、2.20オングストローム、2.25オングストローム、2.10オングストローム、2.10オングストローム、2.25オングストロームで決定した(特願2003-358459号及び特願2004-259125号)。構造解析された8つの立体構造はカルシウム結合部位を含む活性部位近辺を除きほとんど同じであった。PAD4はブーツ型の細長い形をしており、結晶格子内の最近接分子と結晶学的な2回軸で関係付けられて機能的な2量体を形成していた。PAD4分子はN末端ドメインとC末端ドメインの2つに分けることができるが、N末端ドメインはさらに2つのサブドメインに分けられ、2つのサブドメインを合わせた構造は免疫グロブリン様の構造をとるT-cell surface glycoprotein CD4に類似するとともに、1つのサブドメインの構造はさらにp53のDNA結合ドメインとも類似していた。一方、C末端ドメインは5つの β β α β プロペラ構造から構成され、その中心部に負に帯電した大きな溝が存在していた。溝の内部には活性残基であるAsp350, His471, Asp473, Cys645とカルシウムイオンが2つ存在し、活性残基部位近辺の構造はamidinotransferase(AT)とN(G), N(G)-dimethyl-L-arginine amidinohydrolaseと類似していた。カルシウムイオンが存在しないPAD4と活性残基近辺の構造を比較すると、2

つのカルシウムイオンが負に帯電した大きな溝に結合することによりC645 (A645) およびAsp350近傍の構造が大きく変化してクレフトが形成され、そこに基質が結合することが明らかとなった。また、いずれのカルシウムイオンの結合様式もよく知られているEFハンドモチーフとは明らかに異なっていた。以上の結果から、PAD4はアルギニン修飾酵素のスーパーファミリーに属するタンパク質であるが、活性部位の2つのカルシウムイオンが触媒活性を制御し、その結合様式はカルシウム結合モチーフとして知られているEFハンドモチーフをもつタンパク質とは異なるので、これまでないまったく新しいカルシウムイオンによる酵素の活性化機構を有するタンパク質であることが明らかとなった。

[0008] ところで、白井らはプログラムPSI-BLAST、FUGUEによってアルギニンprocessing enzymeが共通のフォールドを持つことを推測し、アルギニンの脱イミノ化の反応機構を提唱した(Shirai, H., Blundell, T. L. and Mizuguchi, K. (2001) A novel superfamily of enzymes that catalyze the modification of guanidino groups. TIBS, 26, 465-468)。さらに、DasらはMycoplasma arginini由来のアルギニンデイミナーゼと反応中間体との複合体のX線結晶構造解析を行い、L-アルギニンの脱イミノ化の反応機構を提唱した(Das et al. (2004) Crystal structures of arginine deiminase with covalent reaction intermediates: Implication for catalytic mechanism)。本発明者らのBA-Ca²⁺ PAD4 (C645A) の構造解析により、ペプチジルアルギニン(PAD4の反応基質)の脱イミノ化反応のメカニズムにおける基質認識機構がDasらによって提唱されたモデルと一致していることが示されたので、PAD4によるタンパク質の脱イミノ化反応はDasらによって提唱されている2段階の反応機構、すなわち、第1段階では、Cys645のチオール基がペプチジルアルギニンのグアニジノ基の炭素C α を求核攻撃してtetrahedral adductが形成され、その後、Asp350とAsp473が基質と水素結合及び塩橋を形成することによってグアニジノ基の炭素C α の求核性が高められ、グアニジノ基のC α とNh2の間の結合が切断されてアンモニアが生成する。そして、第2段階では、His471によって活性化された水分子がC α を求核攻撃して再度tetrahedral adductが形成された後、C α とCys645の硫黄原子S γ の間の結合が開裂してペプチジルシトルリン残基(PAD4の反応生成物)が生ずるものと考えられる。本発明者らが提唱するPAD4の脱イミノ化

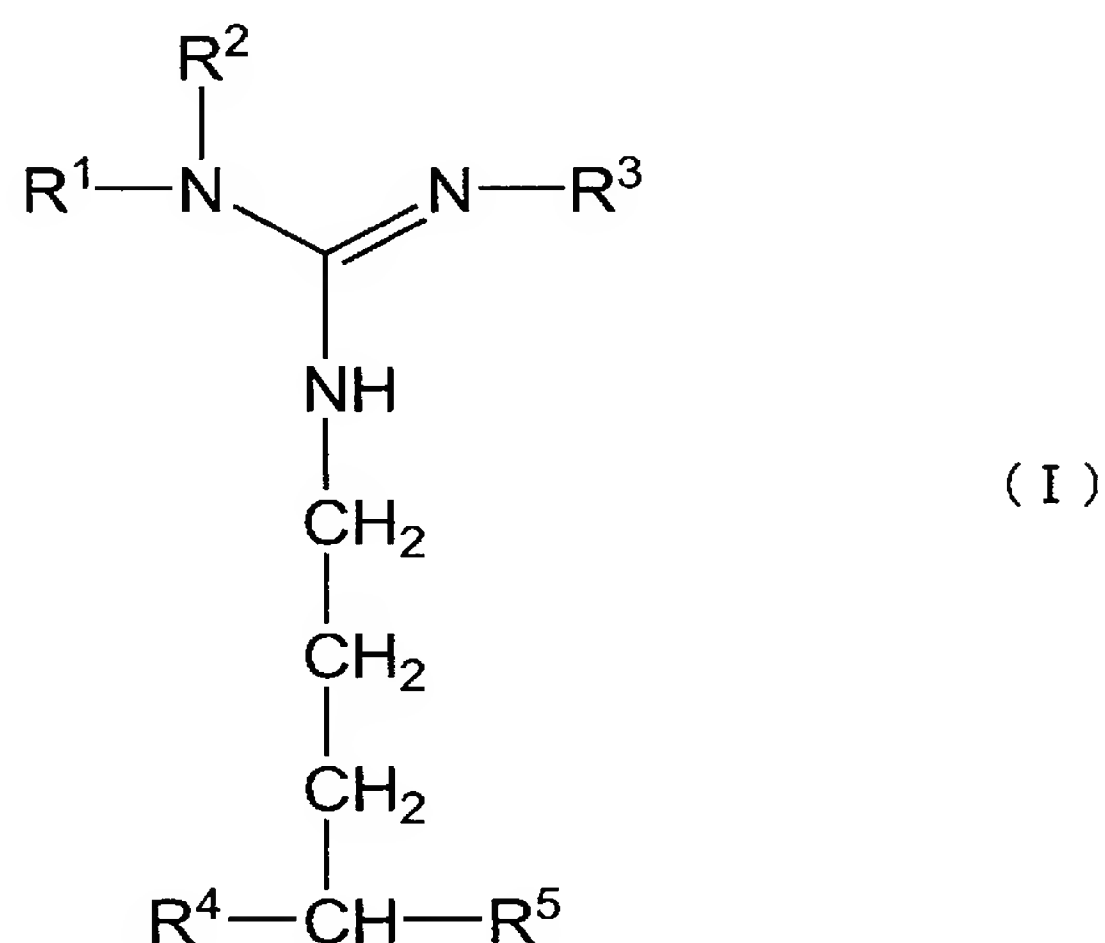
反応機構を図1に示す。

[0009] 以上の知見に基づき、本発明者らは、PAD4の酵素活性を阻害する新たな化合物を設計および作製して、PAD4阻害活性を測定した。その結果、これらの化合物がPAD4阻害活性を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] 本発明の要旨は以下の通りである。

[0011] (1) 下記の一般式(I)で表される化合物またはその塩。

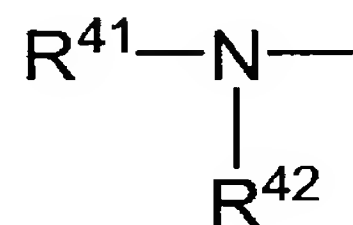
[0012] [化7]



(式中、 R^1 、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、水素原子または炭素数1〜3のアルキル基であるが、ただし、 R^1 、 R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つは水素原子ではなく、 R^4 は置換基を有するアミノ基であり、 R^5 は置換基を有してもよいカルボキシル基である)

(2) R^4 が、下記の式

[0013] [化8]



(式中、 R^{41} は、 $\text{R}^{401}\text{CO}-$ 〔式中、 R^{401} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基である〕で表される基、 $\text{R}^{402}\text{S}(\text{O})_{\text{m}}-$ 〔式中、 R^{402} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素

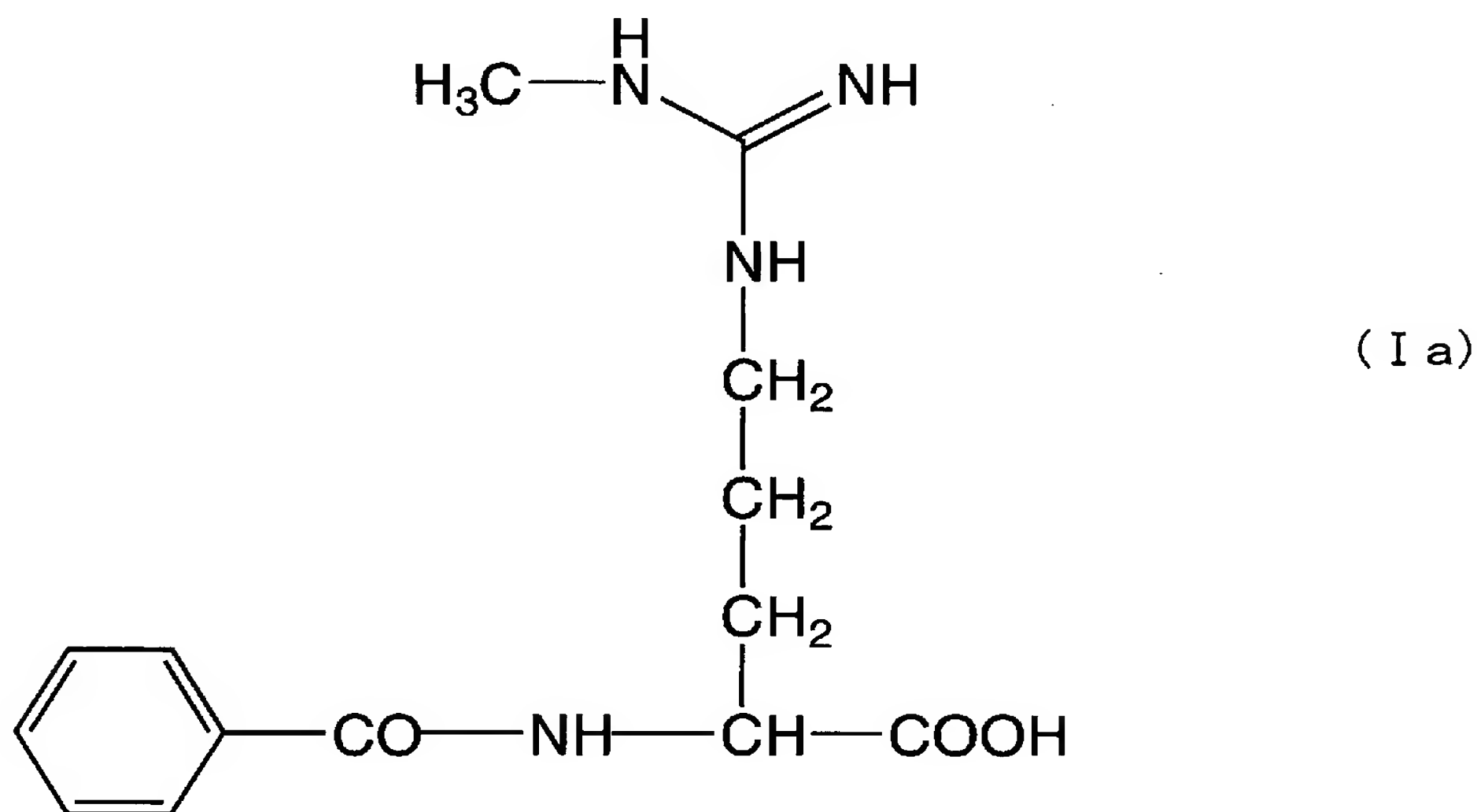
環基であり、 m は1または2の整数である]で表される基、 $R^{405}N(R^{406})-CHR^{404}-CO-[NH-CHR^{403}-CO]_n-$ [式中、 R^{403} , R^{404} , R^{405} および R^{406} は、それぞれ独立に、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 n は1〜50のいずれかの整数である]で表される基または置換基を有してもよいペプチジル基、 R^{42} は水素原子または炭素数1〜3のアルキル基である)で表される基である(1)記載の化合物またはその塩。

[0014] (3) R^{41} が、置換基を有してもよいベンゾイル基、置換基を有してもよいベンゾイルペプチジル基、置換基を有してもよいダンシル基または置換基を有してもよいダンシルペプチジル基であり、 R^{42} が水素原子である(2)記載の化合物またはその塩。

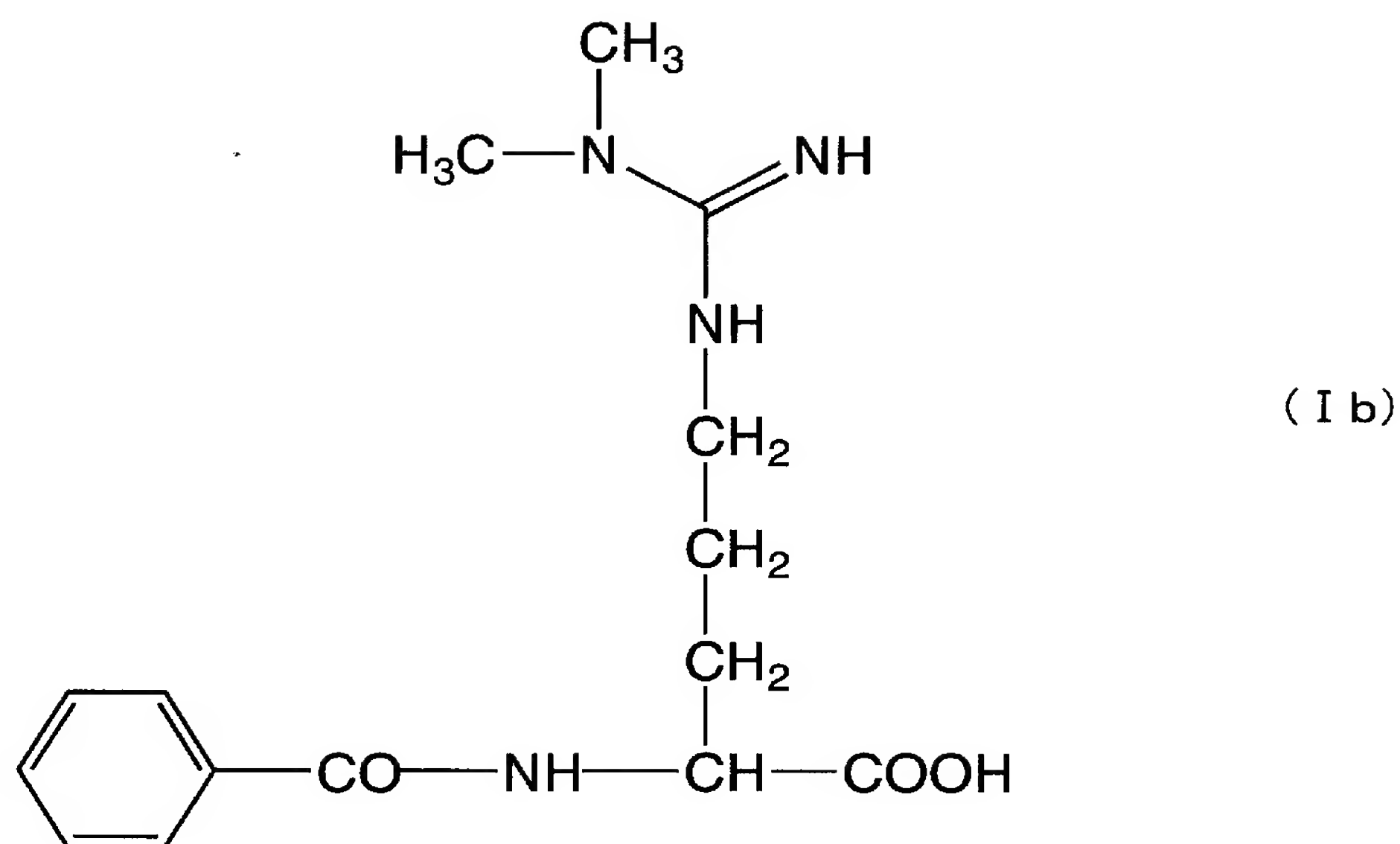
[0015] (4) R^1 , R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、水素原子またはメチル基であるが、ただし、 R^1 , R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つはメチル基である(1)〜(3)のいずれかに記載の化合物またはその塩。

[0016] (5) 下記の(Ia)、(Ib)または(Ic)で表される化合物またはその塩である(4)記載の化合物またはその塩。

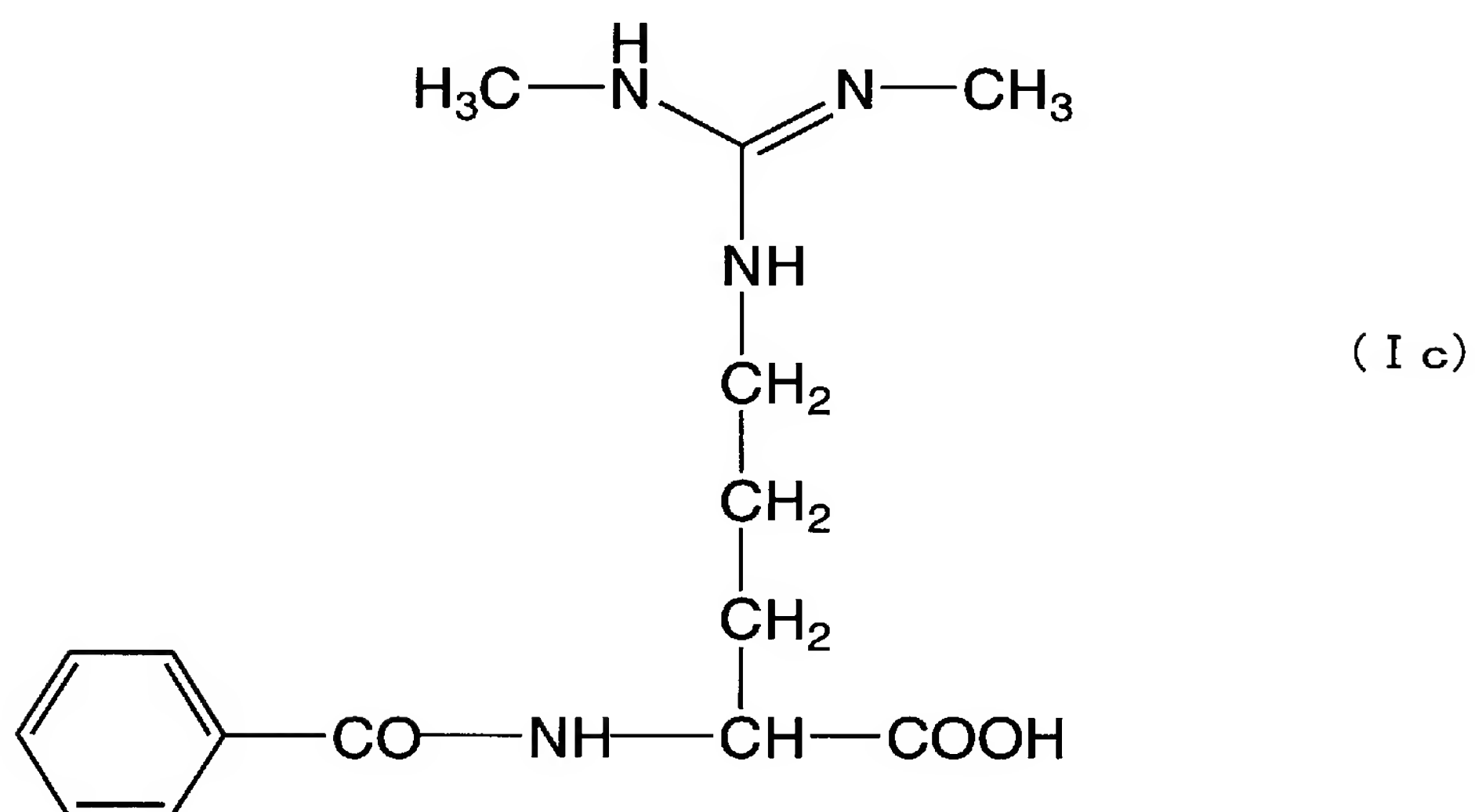
[0017] [化9]



[0018] [化10]

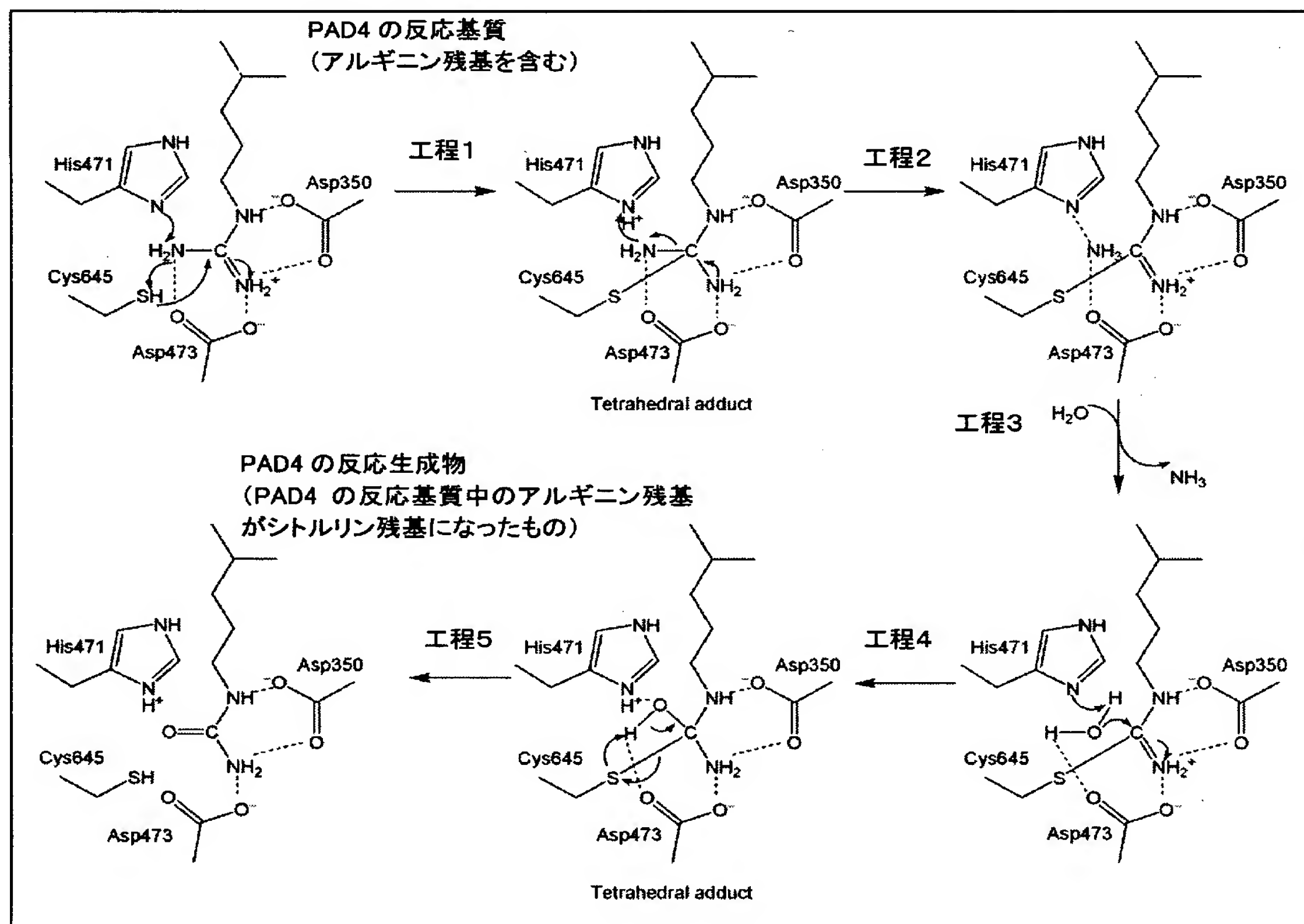


[0019] [化11]



(6) 下記のスキームで表される、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質を有効成分として含有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。

[0020] [化12]



(スキーム中、Asp350, His471, Asp473及びCys645は、それぞれ、配列番号1のアミノ酸配列における350位のアスパラギン酸残基、471位ヒスチジン残基、473位のアスパラギン酸残基及び645位のシステイン残基を表す)

(7) 配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1～5のいずれかを阻害することができる物質がアルギニン誘導体である(6)記載のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。

[0021] (8) アルギニンのアミノ基およびグアニジノ基が置換基を有し、アルギニンのカルボキシル基が置換基を有してもよいアルギニン誘導体を有効成分として含有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。

[0022] (9) アルギニン誘導体が(1)～(5)のいずれかに記載の化合物またはその塩である(7)または(8)記載のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。

[0023] (10) ペプチジルアルギニンデイミナーゼが関与する疾患を予防および／または治療するために用いられる(6)～(9)のいずれかに記載のペプチジルアルギニンデイミ

ナーゼ4阻害剤。

[0024] (11) ペプチジルアルギニンデイミナーゼが関与する疾患が、関節リウマチ、乾癬及び多発性硬化症からなる群より選択される(10)記載のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。

[0025] 本明細書において、「ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4」とは、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4のことであり、同様の生物学的活性(すなわち、カルシウムイオン存在下でタンパク質中のアルギニン残基を脱イミノ化してシトルリン残基に変換する反応を触媒する酵素活性)を有し、かつ、配列番号1のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列をもつものも包含する。

[0026] また、本明細書において、Bocはt-ブトキシ基、Argはアルギニン、Tosはp-トルエンスルフォニル、Meはメチル基、ADMAは N^G, N^G -ジメチル-L-アルギニン、SDMAは N^G, N'^G -ジメチル-L-アルギニン、Bzはベンゾイル基を表す。

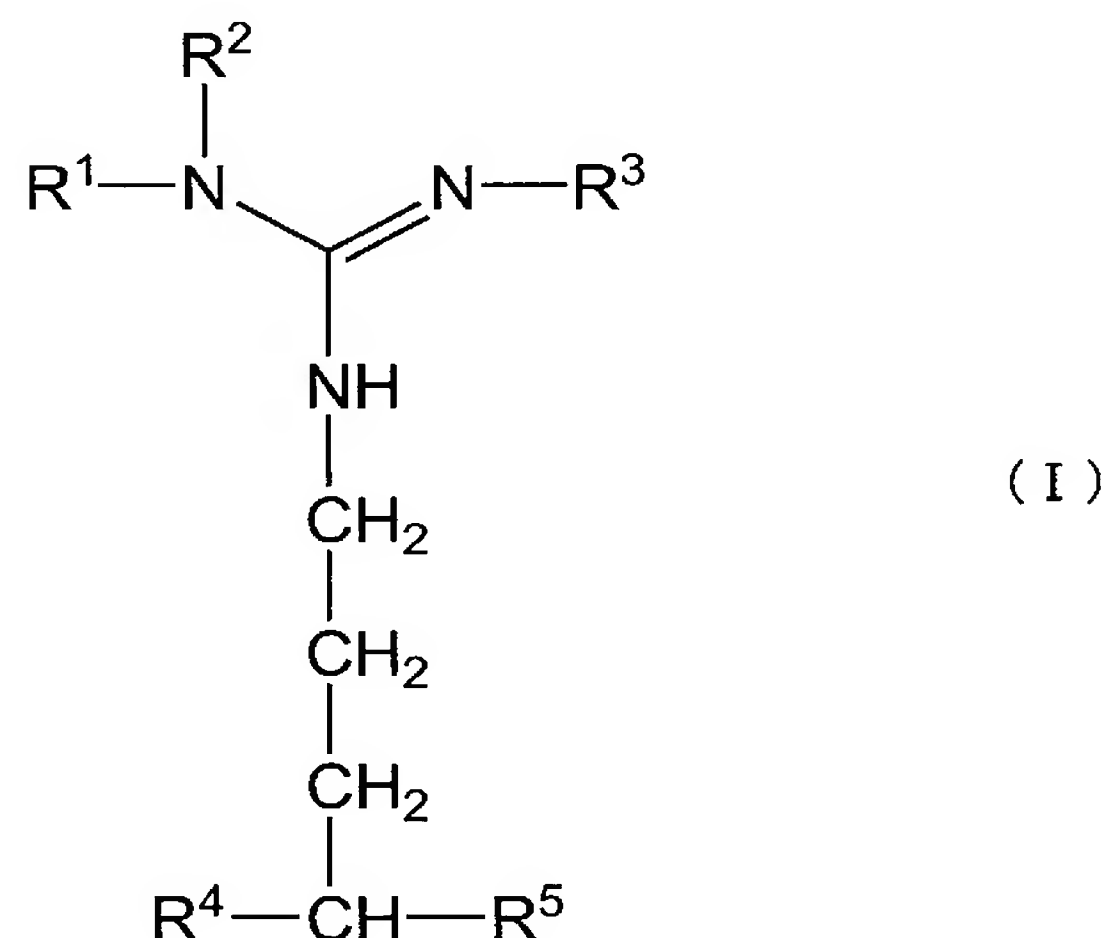
[0027] なお、本明細書において、「—」はその前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

[0028] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0029] 1. 一般式(I)で表される化合物またはその塩

本発明は、一般式(I)で表される化合物またはその塩を提供する。

[0030] [化13]



一般式(I)で表される化合物またはその塩は、L体、D体、DL体のいずれであっても

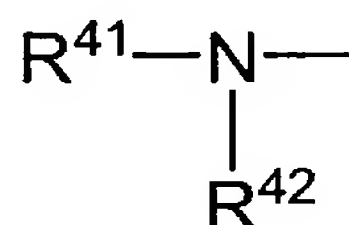
よいが、L体が効果的である。

[0031] 一般式(I)において、 R^1 、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、水素原子または炭素数1〜3のアルキル基であるが、ただし、 R^1 、 R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つは水素原子ではない。炭素数1〜3のアルキル基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基を挙げることができる。

[0032] R^1 、 R^2 および R^3 が、それぞれ独立に、水素原子またはメチル基であるが、ただし、 R^1 、 R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つはメチル基であることが好ましい。

[0033] 一般式(I)において、 R^4 は置換基を有するアミノ基である。 R^4 のアミノ基に付加される置換基は、その置換基を有する化合物がPAD4に認識される(すなわち、PAD4と相互作用する)限り、いかなるものであってもよいが、 R^4 のアミノ基の窒素に直接結合する原子にオキシ基(=O)が結合しているものが好ましい。 R^4 の一例として、下記の式で表される基を挙げることができる。

[0034] [化14]



上式において、 R^{41} は、 $R^{401}CO-$ [式中、 R^{401} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基である]で表される基、 $R^{402}S(O)_m-$ [式中、 R^{402} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 m は1または2の整数である]で表される基、 $R^{405}N(R^{406})-CH$
 $R^{404}-CO-[NH-CHR^{403}-CO]_n-$ [式中、 R^{403} 、 R^{404} 、 R^{405} および R^{406} は、それぞれ独立に、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 n は1〜50のいずれかの整数である]で表される基または置換基を有してもよいペプチジル基であり、 R^{42} は水素原子または炭素数1〜3のアルキル基である。
 $R^{405}N(R^{406})-CHR^{404}-CO-$ で表される基及び $-NH-CHR^{403}-CO-$ で表される基としては、天然のタンパク質やペプチド中に存在するアミノ酸残基を例示することができる。 R^{41} のペプチジル基の置換基としては、ベンゾイル基、ダンシル基などを挙げる

ことができ、このベンゾイル基、ダンシル基などはさらに置換基を有してもよい。ベンゾイル基、ダンシル基などの置換基としては、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)、水酸基、炭素数1〜6のアルコキシ基(例えば、メキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペントキシなど)、アミノ基、カルバモイル基、炭素数1〜6のアルコキシカルボニル基(例えば、メキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニルなど)、複素環基(複素環基の複素環としては、1個の硫黄原子、窒素原子または酸素原子を含む5〜7員環、2〜4個の窒素原子を含む5〜6員環、1〜2個の窒素原子および1個の硫黄原子または酸素原子を含む5〜6員環などを挙げることができ、これらの複素環は1〜2個の窒素原子を含む6員環、ベンゼン環または1個の硫黄原子を含む5員環と縮合していてもよく、複素環基の具体例としては、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピリド[2, 3-d]ピリミジル、ベンゾピラニル、1, 8-ナフチリジル、1, 5-ナフチリジル、1, 6-ナフチリジル、1, 7-ナフチリジル、キノリル、チエノ[2, 3-b]ピリジル、テトラゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、トリアジニル、トリアゾリル、チエニル、ピロリル、ピロリニル、フリル、ピロリジニル、ベンゾチエニル、インドリル、イミダゾリジニル、ピペリジル、ピペリジノ、ピペラジニル、モルホリニル、モルホリノなどを挙げることができる)などを挙げることができる。アミノ基は炭素数1〜6のアルキル基や炭素数1〜10のアシル基で置換されていてもよい。また、カルバモイル基は、炭素数1〜6のアルキル基で置換されていてもよい。

[0035] R^{401} 、 R^{402} 、 R^{403} 、 R^{404} 、 R^{405} および R^{406} の炭化水素基としては、飽和鎖式炭化水素基(例えば、炭素数1〜6の直鎖状および分枝状アルキル基など)、不飽和鎖式炭化水素基(例えば、炭素数1〜6の直鎖状および分枝状アルケニル基、炭素数1〜6の直鎖状および分枝状アルキニル基など)、脂環式炭化水素基(例えば、炭素数1〜6のシクロアルキル基、炭素数1〜6のシクロアルケニル基、炭素数1〜6のシクロアルキニル基など)、芳香族炭化水素基(例えば、フェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基など)を挙げることができる。

[0036] R^{401} 、 R^{402} 、 R^{403} 、 R^{404} 、 R^{405} および R^{406} が置換基を有してもよい炭化水素基である場

合の置換基としては、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)、水酸基、炭素数1〜6のアルコキシ基(例えば、メキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペントキシなど)、アミノ基、カルバモイル基、炭素数1〜6のアルコキシカルボニル基(例えば、メキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニルなど)、複素環基(複素環基の複素環としては、1個の硫黄原子、窒素原子または酸素原子を含む5〜7員環、2〜4個の窒素原子を含む5〜6員環、1〜2個の窒素原子および1個の硫黄原子または酸素原子を含む5〜6員環などを挙げることができ、これらの複素環は1〜2個の窒素原子を含む6員環、ベンゼン環または1個の硫黄原子を含む5員環と縮合していてもよく、複素環基の具体例としては、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピリド[2, 3-d]ピリミジル、ベンゾピラニル、1, 8-ナフチリジル、1, 5-ナフチリジル、1, 6-ナフチリジル、1, 7-ナフチリジル、キノリル、チエノ[2, 3-b]ピリジル、テトラゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、トリアジニル、トリアゾリル、チエニル、ピロリル、ピロリニル、フリル、ピロリジニル、ベンゾチエニル、インドリル、イミダゾリジニル、ピペリジル、ピペリジノ、ピペラジニル、モルホリニル、モルホリノなどを挙げることができる)などを挙げることができる。アミノ基は炭素数1〜6のアルキル基や炭素数1〜10のアシル基で置換されていてもよい。また、カルバモイル基は、炭素数1〜6のアルキル基で置換されていてもよい。

[0037] R^{401} 、 R^{402} 、 R^{403} 、 R^{404} 、 R^{405} および R^{406} の複素環基における複素環としては、1個の硫黄原子、窒素原子または酸素原子を含む5〜7員環、2〜4個の窒素原子を含む5〜6員環、1〜2個の窒素原子および1個の硫黄原子または酸素原子を含む5〜6員環などを挙げることができ、これらの複素環は1〜2個の窒素原子を含む6員環、ベンゼン環または1個の硫黄原子を含む5員環と縮合していてもよい。複素環基の具体例としては、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピリド[2, 3-d]ピリミジル、ベンゾピラニル、1, 8-ナフチリジル、1, 5-ナフチリジル、1, 6-ナフチリジル、1, 7-ナフチリジル、キノリル、チエノ[2, 3-b]ピリジル、テトラゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、トリアジニル、トリアゾリル、チエニル、ピロリ

ル、ピロリニル、フリル、ピロリジニル、ベンゾチエニル、インドリル、イミダゾリジニル、ピペリジル、ピペリジノ、ピペラジニル、モルホリニル、モルホリノなどを挙げることができる。

[0038] R^{401} 、 R^{402} 、 R^{403} 、 R^{404} 、 R^{405} および R^{406} が置換基を有してもよい複素環基である場合の置換基としては、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)、水酸基、炭素数1〜6のアルキル基(例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基など)、炭素数1〜6のアルコキシ基(例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペントキシなど)、アミノ基、カルバモイル基、炭素数1〜6のアルコキシカルボニル基(例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニルなど)、上記の複素環などを挙げることができる。アミノ基は炭素数1〜6のアルキル基や炭素数1〜10のアシル基で置換されていてもよい。また、カルバモイル基は、炭素数1〜6のアルキル基で置換されていてもよい。

[0039] R^{42} の炭素数1〜3のアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基を挙げることができる。

[0040] R^{41} が、置換基を有してもよいベンゾイル基、置換基を有してもよいベンゾイルペプチジル基、置換基を有してもよいダンシル基または置換基を有してもよいダンシルペプチジル基であり、 R^{42} が水素原子であることが好ましい。

一般式(I)において、 R^5 は置換基を有してもよいカルボキシル基である。 R^5 が置換基を有するカルボキシル基である場合の置換基はいかなるものであってもよい。例えば、PAD4に対する阻害活性を上げるためには、 R^5 は、 $-\text{COOR}^{51}$ (式中、 R^{51} は炭素数1〜20のアルキル基である)で表される基、 $-\text{COO}-\{R^{54}\text{N}(R^{55})-\text{CHR}^{53}-\text{CO}-[\text{NH}-\text{CHR}^{52}-\text{CO}]_p-\}$ [式中、 R^{52} 、 R^{53} 、 R^{54} および R^{55} は、それぞれ独立に、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 p は1〜50のいずれかの整数である]で表される基などであるとよい。 $R^{54}\text{N}(R^{55})-\text{CHR}^{53}-\text{CO}-$ で表される基及び $-\text{NH}-\text{CHR}^{52}-\text{CO}-$ で表される基としては、天然のタンパク質やペプチド中に存在するアミノ酸残基を例示することができる。

R^{51} のアルキル基は、炭素数1〜20の直鎖状および分枝状アルキル基のいずれでもよく、具体的には、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル、

i-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなどを挙げることができる。

R^{52} 、 R^{53} 、 R^{54} および R^{55} の炭化水素基としては、飽和鎖式炭化水素基(例えば、炭素数1〜6の直鎖状および分枝状アルキル基など)、不飽和鎖式炭化水素基(例えば、炭素数1〜6の直鎖状および分枝状アルケニル基、炭素数1〜6の直鎖状および分枝状アルキニル基など)、脂環式炭化水素基(例えば、炭素数1〜6のシクロアルキル基、炭素数1〜6のシクロアルケニル基、炭素数1〜6のシクロアルキニル基など)、芳香族炭化水素基(例えば、フェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基など)を挙げることができる。

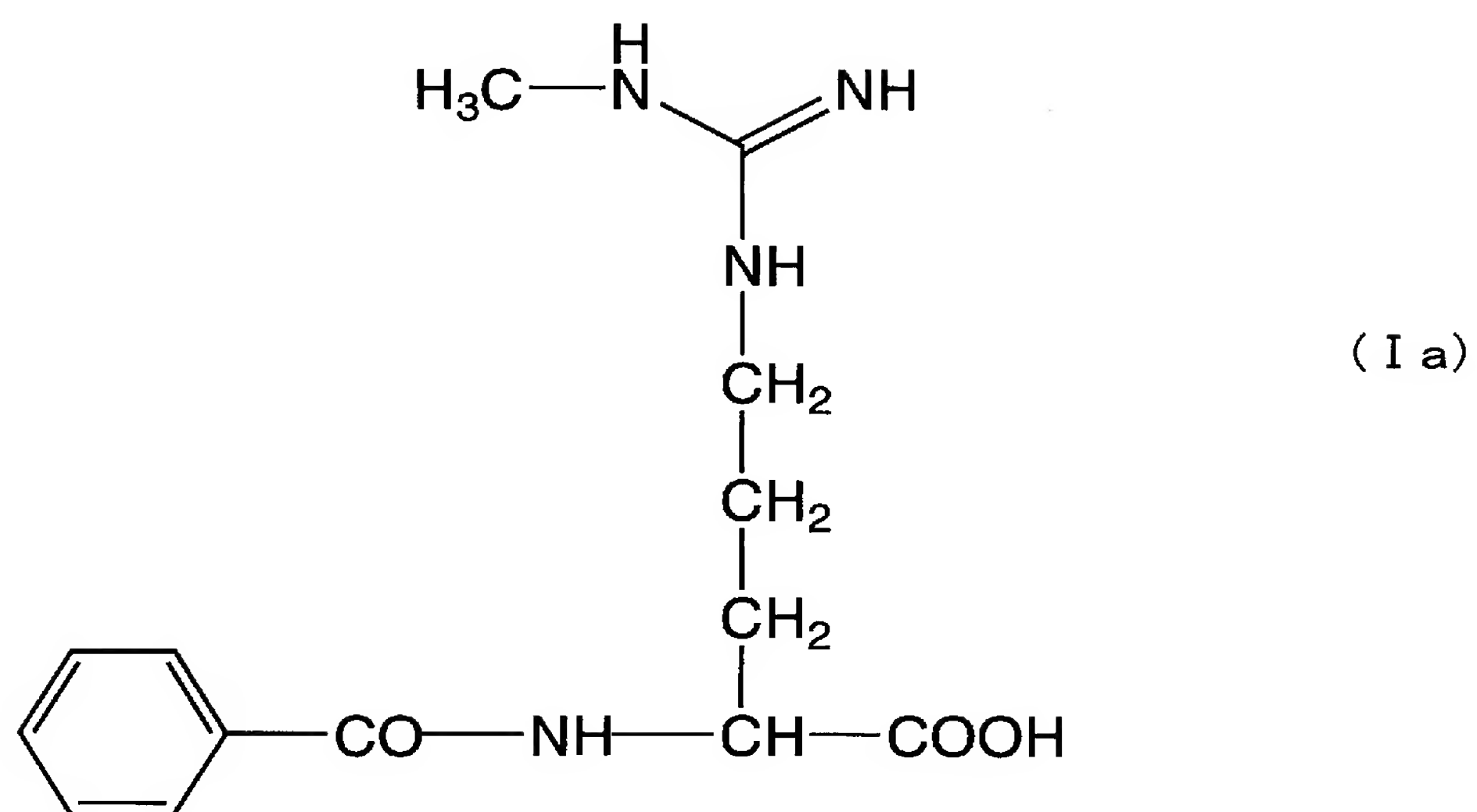
R^{52} 、 R^{53} 、 R^{54} および R^{55} が置換基を有してもよい炭化水素基である場合の置換基としては、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)、水酸基、炭素数1〜6のアルコキシ基(例えば、メキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペントキシなど)、アミノ基、カルバモイル基、炭素数1〜6のアルコキシカルボニル基(例えば、メキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニルなど)、複素環基(複素環基の複素環としては、1個の硫黄原子、窒素原子または酸素原子を含む5〜7員環、2〜4個の窒素原子を含む5〜6員環、1〜2個の窒素原子および1個の硫黄原子または酸素原子を含む5〜6員環などを挙げることができ、これらの複素環は1〜2個の窒素原子を含む6員環、ベンゼン環または1個の硫黄原子を含む5員環と縮合していてもよく、複素環基の具体例としては、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピリド[2, 3-d]ピリミジル、ベンゾピラニル、1, 8-ナフチリジル、1, 5-ナフチリジル、1, 6-ナフチリジル、1, 7-ナフチリジル、キノリル、チエノ[2, 3-b]ピリジル、テトラゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、トリアジニル、トリアゾリル、チエニル、ピロリル、ピロリニル、フリル、ピロリジニル、ベンゾチエニル、インドリル、イミダゾリジニル、ピペリジル、ピペリジノ、ピペラジニル、モルホリニル、モルホリノなどを挙げることができる)などを挙げることができる。アミノ基は炭素数1〜6のアルキル基や炭素数1〜10のアシル基で置換されていてもよい。また、カルバモイル基は、炭素数1〜6のアルキル基で置換されていてもよい。

R^{52} 、 R^{53} 、 R^{54} および R^{55} の複素環基における複素環としては、1個の硫黄原子、窒素原子または酸素原子を含む5〜7員環、2〜4個の窒素原子を含む5〜6員環、1〜2個の窒素原子および1個の硫黄原子または酸素原子を含む5〜6員環などを挙げることができる。これらの複素環は1〜2個の窒素原子を含む6員環、ベンゼン環または1個の硫黄原子を含む5員環と縮合していてもよい。複素環基の具体例としては、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピリド[2, 3-d]ピリミジル、ベンゾピラニル、1, 8-ナフチリジル、1, 5-ナフチリジル、1, 6-ナフチリジル、1, 7-ナフチリジル、キノリル、チエノ[2, 3-b]ピリジル、テトラゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、トリアジニル、トリアゾリル、チエニル、ピロリル、ピロリニル、フリル、ピロリジニル、ベンゾチエニル、インドリル、イミダゾリジニル、ピペリジル、ピペリジノ、ピペラジニル、モルホリニル、モルホリノなどを挙げることができる。

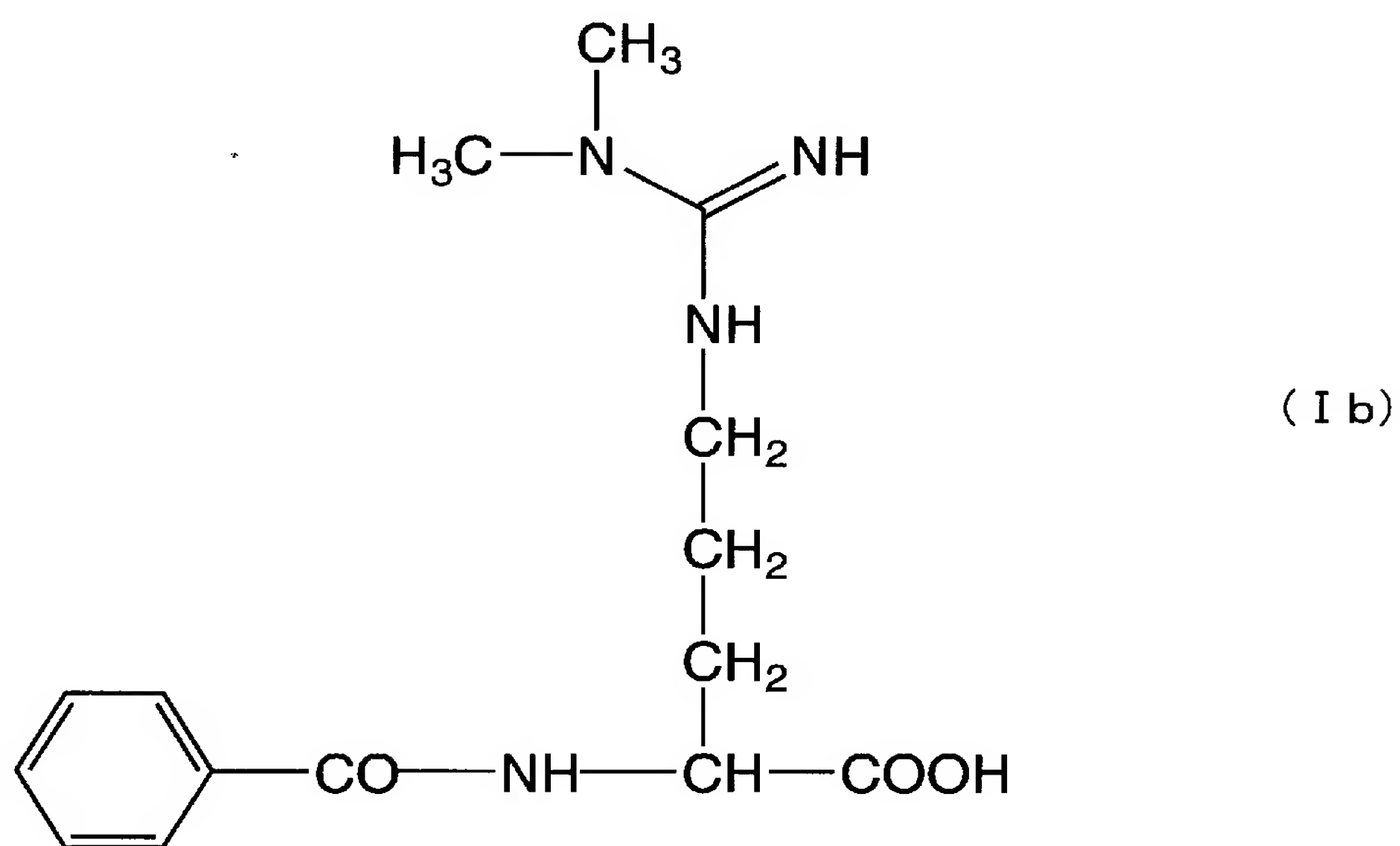
R^{52} 、 R^{53} 、 R^{54} および R^{55} が置換基を有してもよい複素環基である場合の置換基としては、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)、水酸基、炭素数1〜6のアルキル基(例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基など)、炭素数1〜6のアルコキシ基(例えば、メキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペントキシなど)、アミノ基、カルバモイル基、炭素数1〜6のアルコキシカルボニル基(例えば、メキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニルなど)、上記の複素環基などを挙げることができる。アミノ基は炭素数1〜6のアルキル基や炭素数1〜10のアシル基で置換されていてもよい。また、カルバモイル基は、炭素数1〜6のアルキル基で置換されていてもよい。

一般式(I)で表される化合物の具体例として、下記の(Ia)、(Ib)または(Ic)で表される化合物を挙げることができる。

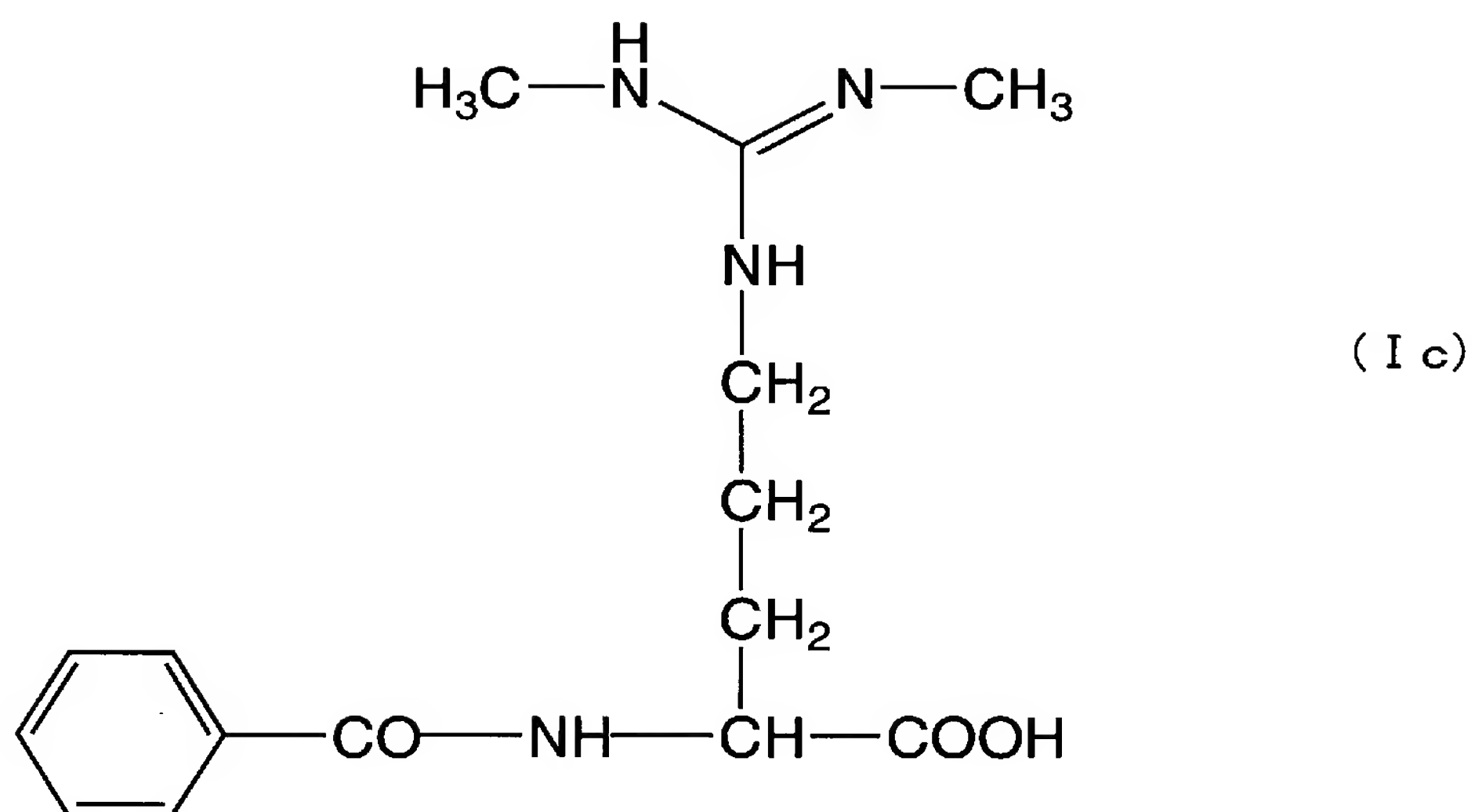
[0041] [化15]



[0042] [化16]



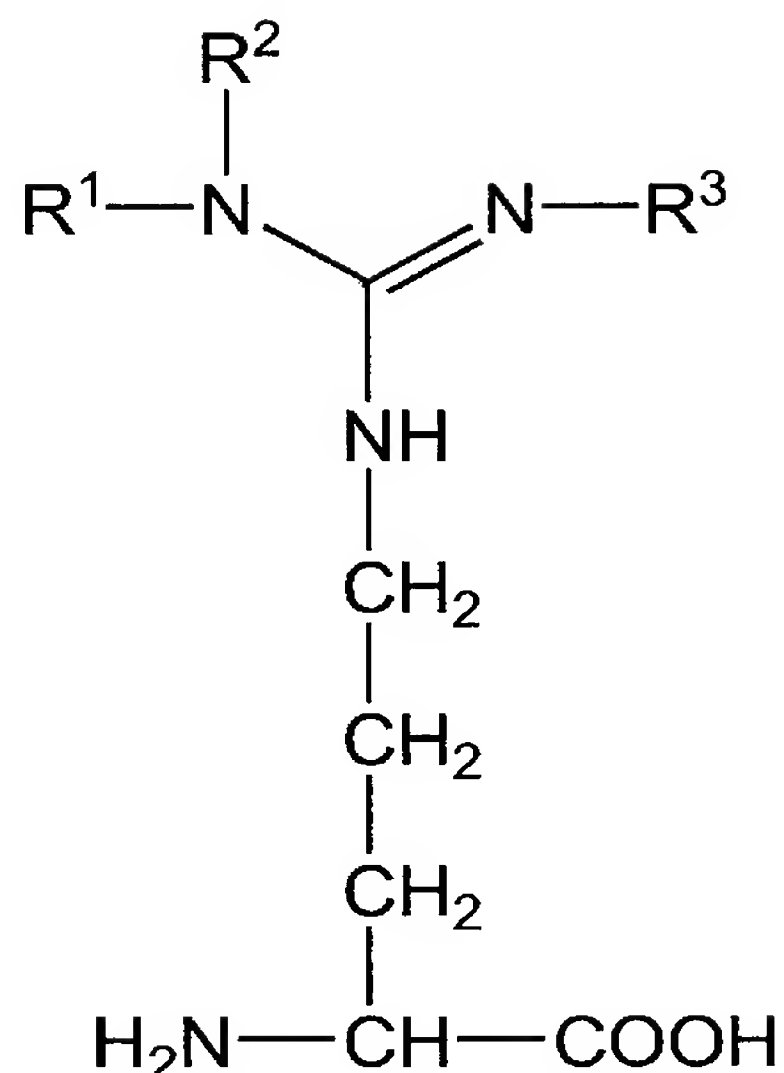
[0043] [化17]



式(Ia)で表される化合物はBz-Arg(mono-methyl)である。式(Ib)で表される化合物はBz-ADMAである。式(Ic)で表される化合物はBz-SDMAである。

一般式(I)で表される化合物は、市販のアルギニンまたは下記の構造式で表されるアルギニン誘導体を出発物質として合成することができる。

[0044] [化18]



(式中、 R^1 、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、水素原子または炭素数1〜3のアルキル基であるが、ただし、 R^1 、 R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つは水素原子ではない)

一般式(I)において、 R^4 が $\text{R}^{401} - \text{CO} - \text{NH} -$ (式中、 R^{401} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基である)で表される基であり、 R^5 がカルボキシ基である化合物は、出発物質である上記のアルギニンまたはアルギニン誘導体を $\text{R}^{401} \text{CO} - \text{O} - \text{COR}^{401}$ で表される酸対称無水物でのアシル化または Bz_2O (安息香酸無水物、benzoic anhydride)でベンゾイル化することにより製造することができる。ベンゾイル化反応は公知の方法で行うことができる。例えば、不活性溶媒中で、塩基の存在下に、ベンゾイル化反応を行うとよい。この反応に用いられる不活性溶媒としては、例えば、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルフォキシド(DMSO)、テトラヒドロフラン(THF)などと水あるいはこれらの混合物などを挙げることができる。また、塩基としては、炭酸水素ナトリウムあるいは炭酸水素カリウムを用い、アルギニン側鎖のグアニジノ骨格の pK_a が約12であることを考慮し、反応溶液の pH が約10以下になるようにする。反応温度は約0〜37℃が適当であり、反応時間は約10分〜約24時間が適当である。 Bz_2O の使用量はアルギニンまたはアルギニン誘導体(出発物質)の1モルに対して約1〜1.2モルが適当である。

一般式(I)において、 R^4 が $R^{402}-S(O)_m-NH-$ (式中、 R^{402} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 m は1または2の整数である)で表される基であり、 R^5 がカルボキシル基である化合物は、例えば $m=2$ の場合、出発物質である上記のアルギニンまたはアルギニン誘導体をDNS-Cl(ダンシルクロリド)でダンシル化することにより製造することができる。ダンシル化反応は公知の方法で行うことができる(B.S. Hartley, V. Massey, Biochim. Biophys. Acta, 21, 58 (1956))。例えば、不活性溶媒中で、塩基の存在下に、ダンシル化反応を行うとよい。この反応に用いられる不活性溶媒としては、例えば、アセトン、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルフォキシド(DMSO)、テトラヒドロフラン(THF)などと水あるいはこれらの混合物などを挙げることができる。また、塩基としては、炭酸水素ナトリウムあるいは炭酸水素カリウムを用い、アルギニン側鎖のグアニジノ骨格の pK_a が約12であることを考慮し、反応溶液の pH が約10以下になるようにする。反応温度は約0〜37℃が適当であり、反応時間は約10分〜約24時間が適当である。DNS-Clの使用量は、アルギニンまたはアルギニン誘導体(出発物質)の1モルに対して約1〜1.2モルが適当であり、濃度を5 mM付近にするのがのぞましい。

一般式(I)において、 R^4 が $R^{405}N(R^{406})-CHR^{404}-CO-[NH-CHR^{403}-CO]_n-NH-$ (式中、 R^{403} , R^{404} , R^{405} および R^{406} は、それぞれ独立に、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 n は1〜50のいずれかの整数である)で表される基であり、 R^5 がカルボキシル基である化合物は、たとえば以下の方法により合成することができる。まず、出発物質である上記のアルギニンまたはアルギニン誘導体を、ベンゾイル化と同様に、 Boc_2O (t-ブチルオキシカルボニル酸対象無水物)によりBoc化する。得られたBoc-Argあるいはその誘導体を公知の方法を用い(J. Ramachandran, C.H. Li, J. Org. Chem., 27, 4006 (1962))、p-トルエンスルフォニルクロリドにより、側鎖のグアニジノ基をトシル化する。この誘導体を用いることで、公知の方法(ノーベル化学賞受賞)であるペプチドの固相合成法により(R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963))、上記ペプチドを得ることが可能である。

一般式(I)において、 R^4 が $R^{41}-NH-$ (式中、 R^{41} は置換基を有してもよいベンゾイル

ペプチジル基である]であり、 R^5 がカルボキシル基である化合物は、たとえば以下の方法により合成することができる。

まず、既知の方法であるFmoc固相合成法(Atherton, E. and Sheppard, R.C., 1989, Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach., IPF Press, Oxford, UK)を用いてペプチド鎖を合成する。ただし、この時に用いるAsp, Gluには Fmoc-Asp(OcHex), Fmoc-Glu(OcHex)、Lys, Argには Fmoc-Lys(Cl-Z), Fmoc-Arg(Tos)のように側鎖カルボキシル基がTFAで切断を受けず HFで切断されるものを用いる。最後のN末端アミノ酸のFmoc基を除去した後、前述のように、 Bz_2O (安息香酸無水物)を用いて公知の方法によりベンゾイル化をおこなう。次に、ethanedithiol, thioanisoleなどのスカベンジャー試薬の存在下で目的ペプチド樹脂をTFAで処理し、遊離する目的ペプチドをHPLC等で精製する。次に、この遊離ペプチドをDMF等の溶媒に溶解し、氷冷下、 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimideを1等量加えて、ペプチドの無水物の生成後、ArgあるいはArg誘導体を加える。また、この時に加える塩基としては、炭酸水素ナトリウムあるいは炭酸水素カリウムを用い、アルギニン側鎖のグアニジノ骨格のpKaが約12であることを考慮し、反応溶液のpHが約10以下になるようにする。反応温度は約0〜37°Cが適当であり、反応時間は約10分〜約24時間が適当である。最後に、生成したペプチドをHF(無水フッ化水素)で処理し、ベンゾイル基以外のすべての保護基を除去し、精製する。

一般式(I)において、 R^4 が $R^{41}-NH-$ [式中、 R^{41} は置換基を有してもよいダンシルペプチジル基である]であり、 R^5 がカルボキシル基である化合物は、上記反応で、Fmoc基をはずしたあとにdansyl chlorideを加えることにより、ダンシル化し、あとは上記と同様の方法で合成することができる。

一般式(I)において、 R^4 が $R^{401}-CO-NR^{42}-$ (式中、 R^{401} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基である)で表される基であり、 R^5 がカルボキシル基である化合物は、例えば R^{42} がメチル基(CH_3-)である場合、出発物質である上記のアルギニンまたはアルギニン誘導体の N^α -methyl体を $R^{401}C(O)-O-COR^{401}$ で表される酸対称無水物を用いることで製造することができる。例えば

、不活性溶媒中で、塩基の存在下に、反応を行うとよい。この反応に用いられる不活性溶媒としては、例えば、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルフォキシド(DMSO)、テトラヒドロフラン(THF)などと水あるいはこれらの混合物などを挙げることができる。また、塩基としては、炭酸水素ナトリウムあるいは炭酸水素カリウムを用い、アルギニン側鎖のグアニジノ骨格のpKaが約12であることを考慮し、反応溶液のpHが約10以下になるようにする。反応温度は約0ー37℃が適当であり、反応時間は約10分ー約24時間が適当である。酸対称無水物の使用量は、アルギニンまたはアルギニン誘導体のN^a-methyl体(出発物質)の1モルに対して約1ー1.2モルが適当である。

R⁴²がメチル基(CH₃-)である化合物の出発物質として、Boc-N-Me-Arg(Tos)-OHがBACHEM社で市販されている。これをトリフルオロ酢酸で処理して脱Boc反応を行い、N-Me-Arg(Tos)-OHを得ることができる(生化学実験講座1、タンパク質の化学IV-化学修飾とペプチド合成-, p234, 日本生化学編、東京化学同人)。これを、酸対象無水物あるいはBz₂Oを用いてmethyl体のα-アミノ基に様々な修飾を行うことができる。

側鎖グアニジノ基がメチル化され、さらにα-アミノ基がメチル化されたものは、市販のArg(mono-methyl), ADMA, SDMAをBoc化し(T. Nagasawa, K. Kuroiwa, K. Narita, Y. Isowa, Bull. Chem. Soc. Jpn., 46, 1269 (1973))、まず、Boc-Arg(mono-methyl), Boc-ADMA, Boc-SDMAを合成する。つぎに、メチル化された側鎖グアニジノ基をさらにトシル化し(J. Ramachandran, C.H. Li, J. Org. Chem., 27, 4006 (1962))、それぞれのトシル体であるBoc-Arg(mono-methyl,Tos), Boc-ADMA(Tos), Boc-SDMA(Tos)を調製する。これをトリフルオロ酢酸で処理して脱Boc反応を行い、Arg(mono-methyl,Tos), ADMA(Tos), SDMA(Tos)を調製する。これを出発物質とし、N-ベンジリデンアミノ酸にして還元することでN-ベンジル化物とし、ホルマリンとギ酸でメチル化後接触還元してベンジル基を除去することによりN-Me-Arg(mono-methyl,Tos), N-Me-ADMA(Tos), N-Me-SDMA(Tos)を得ることができる(P. Quitt, J. Hellerbach, K. Volger, Helv. Chim. Acta, 46, 327 (1963))。これを前述のように、HFで処理することにより(S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, H. Sugihara, Bull. Chem. Soc. Jpn, 40, 2164 (1967))

N-Me-Arg(mono-methyl), N-Me-ADMA, N-Me-SDMAを得ることができる。これらを出発物質として、酸対象無水物あるいはBz₂Oを用いてmethyl体の α -アミノ基に様々な修飾を行うことができる。

一般式(I)において、 R^4 が $R^{402}-S(O)_m-NR^{42}-$ (式中、 R^{402} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 m は1または2の整数である)で表される基であり、 R^5 がカルボキシル基である化合物は、例えば $m=2$ の場合で R^{42} がメチル基(CH_3-)である場合、出発物質である上記のアルギニンまたはアルギニン誘導体の N^a -methyl体をDNS-Cl(ダンシルクロリド)でダンシル化することにより製造することができる。ダンシル化反応は公知の方法で行うことができる(B.S. Hartley, V. Massey, Biochim. Biophys. Acta, 21, 58 (1956))。例えば、不活性溶媒中で、塩基の存在下に、ダンシル化反応を行うとよい。この反応に用いられる不活性溶媒としては、例えば、アセトン、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルフォキシド(DMSO)、テトラヒドロフラン(THF)などと水あるいはこれらの混合物などを挙げることができる。また、塩基としては、炭酸水素ナトリウムあるいは炭酸水素カリウムを用い、アルギニン側鎖のグアニジノ骨格のpKaが約12であることを考慮し、反応溶液のpHが約10以下になるようにする。反応温度は約0〜37°Cが適当であり、反応時間は約10分〜約24時間が適当である。DNS-Clの使用量は、アルギニンまたはアルギニン誘導体の N^a -methyl体(出発物質)の1モルに対して約1〜1.2モルが適当であり、濃度を5 mM付近にするのがよい。

一般式(I)において、 R^4 が $R^{405}N(R^{406})-CHR^{404}-CO-[NH-CHR^{403}-CO]_n-NR^{42}-$ [式中、 R^{403} , R^{404} , R^{405} および R^{406} は、それぞれ独立に、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 n は1〜50のいずれかの整数である]で表される基であり、 R^5 がカルボキシル基である化合物は、例えば R^{42} がメチル基(CH_3-)である場合、出発物質である上記のアルギニンまたはアルギニン誘導体の N^a -methyl体をベンゾイル化と同様に、Boc₂O(*t*-ブチルオキシカルボニル酸対象無水物)によりBoc化する。得られたBoc-Argあるいはその誘導体の N^a -methyl体を公知の方法を用い(J. Ramachandran, C.H. Li, J. Org. Chem., 27, 4006 (1962))、*p*-トルエンスルフォニルクロリドにより、側鎖のグアニジノ基をトシル化する。この誘導

体を用いることで、公知の方法(ノーベル化学賞受賞)であるペプチドの固相合成法により(R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963))、上記ペプチドを得ることが可能である。

一般式(I)において、 R^4 が $R^{41}-NR^{42}-$ [式中、 R^{41} は置換基を有してもよいベンゾイルペプチジル基である]であり、 R^5 がカルボキシル基である化合物は、例えば R^{42} がメチル基(CH_3-)である場合の合成法の一例を以下に記載する。

まず、既知の方法であるFmoc固相合成法(Atherton, E. and Sheppard, R.C., 1989, Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach., IPF Press, Oxford, UK)を用いてペプチド鎖を合成する。ただし、この時に用いるAsp, GluにはFmoc-Asp(OcHex), Fmoc-Glu(OcHex)、Lys, ArgにはFmoc-Lys(Cl-Z), Fmoc-Arg(Tos)のように側鎖カルボキシル基がTFAで切断を受けずHFで切断されるものを用いる。最後のN末端アミノ酸のFmoc基を除去した後、前述のように、 Bz_2O (安息香酸無水物)を用いて公知の方法によりベンゾイル化をおこなう。次に、ethanedithiol, thioanisoleなどのスカベンジャー試薬の存在下で目的ペプチド樹脂をTFAで処理し、遊離する目的ペプチドをHPLC等で精製する。次に、この遊離ペプチドをDMF等の溶媒に溶解し、氷冷下、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimideを1等量加えて、ペプチドの無水物の生成後、 N^a -methyl化したArgあるいは N^a -methyl化したArg誘導体を加える。また、この時に加える塩基としては、炭酸水素ナトリウムあるいは炭酸水素カリウムを用い、アルギニン側鎖のグアニジノ骨格のpKaが約12であることを考慮し、反応溶液のpHが約10以下になるようにする。反応温度は約0〜37°Cが適当であり、反応時間は約10分〜約24時間が適当である。最後に、生成したペプチドをHF(無水フッ化水素)で処理し、ベンゾイル基以外のすべての保護基を除去し、精製する。

一般式(I)において、 R^4 が $R^{41}-NR^{42}-$ [式中、 R^{41} は置換基を有してもよいダンシルペプチジル基である]であり、 R^5 がカルボキシル基である化合物は、例えば R^{42} がメチル基(CH_3-)である場合、上記反応で、Fmoc基をはずしたあとにdansyl chlorideを加えることにより、ダンシル化し、あとは上記と同様の方法で合成することができる。

R^5 のカルボキシル基に置換基を導入する方法について簡単に説明する。例えば、

R^5 のカルボキシル基にアルキル基(例えばメチル基、エチル基)やベンジル基を導入する場合、公知の方法(H. Yajima, Y. Kiso, K. Kitagawa, Chem. Pharm. Bull., 22, 1079 (1974)およびM. Brenner, W. Huber, Helv. Chim. Acta, 36, 1109 (1953))により、Argあるいはその誘導体のエステル化を行う。得られた物質を出発物質とし、上記のBz化反応等と同様にしてBz化等の反応をおこない、様々な化合物を合成することができる。

また、 R^5 が $-\text{COO}-[\text{NR}^{54}-\text{CHR}^{53}-\text{CO}-(\text{NH}-\text{CHR}^{52}\text{CO}-)]_p$ である場合の化合物の合成法を簡単に説明する。 R^{54} が水素の場合、まず、Merrifield樹脂(ポリスチレン樹脂)にC末端アミノ酸を結合させた保護アミノ酸樹脂をGisin法(B.F. Gisin, Helv. Chem. Acta, 56, 1476 (1973))により調製する。この保護アミノ酸樹脂を出発物質としてp-1回のペプチド固相合成(R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963))を繰り返し、さらに $\text{Boc-NR}^{54}-\text{CHR}^{53}-\text{COOH}$ を縮合させる。次に Boc-Arg(Tos) (ペプチド研究所、大阪箕面)あるいはArg誘導体をp-トルエンスルフォニルクロリドにより、側鎖のグアニジノ基をTos化したもの(J. Ramachandran, C.H. Li, J. Org. Chem., 27, 4006 (1962))を、ペプチド固相合成によりさらに連結させる。これをフッ化水素(HF)で処理することにより(S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, H. Sugihara, Bull. Chem. Soc. Jpn, 40, 2164 (1967))、目的物を得ることができる。

また、 R^5 が $-\text{COO}-[\text{NR}^{54}-\text{CHR}^{53}-\text{CO}-(\text{NH}-\text{CHR}^{52}\text{CO}-)]_p$ であり、 R^{54} がメチル基の場合の化合物は、前述の、 $\text{N-Me-Arg(mono-methyl, Tos)}$, N-Me-ADMA(Tos) , N-Me-SDMA(Tos) をBoc化することで $\text{Boc-N-Me-Arg(mono-methyl, Tos)}$, $\text{Boc-N-Me-ADMA(Tos)}$, $\text{Boc-N-Me-SDMA(Tos)}$ を調製し、これらを上述のペプチド固相合成により目的の位置に導入し、目的物を調製することができる。

一般式(I)で表される化合物が酸性官能基(例えば、カルボキシル基など)を有する場合、常法により塩基(例えば、薬学的に許容され得る塩基)との塩を形成させてもよい。このような塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、アルミニウム塩、カルシウム塩などを挙げることができる。一般式(I)で表される化合物が塩基性官能基(例えば、アミノ基、一置換アミノ基など)を含む場合、常法により酸(例えば、薬学的に許容され得る酸)との塩を形成させてもよい。このような塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩

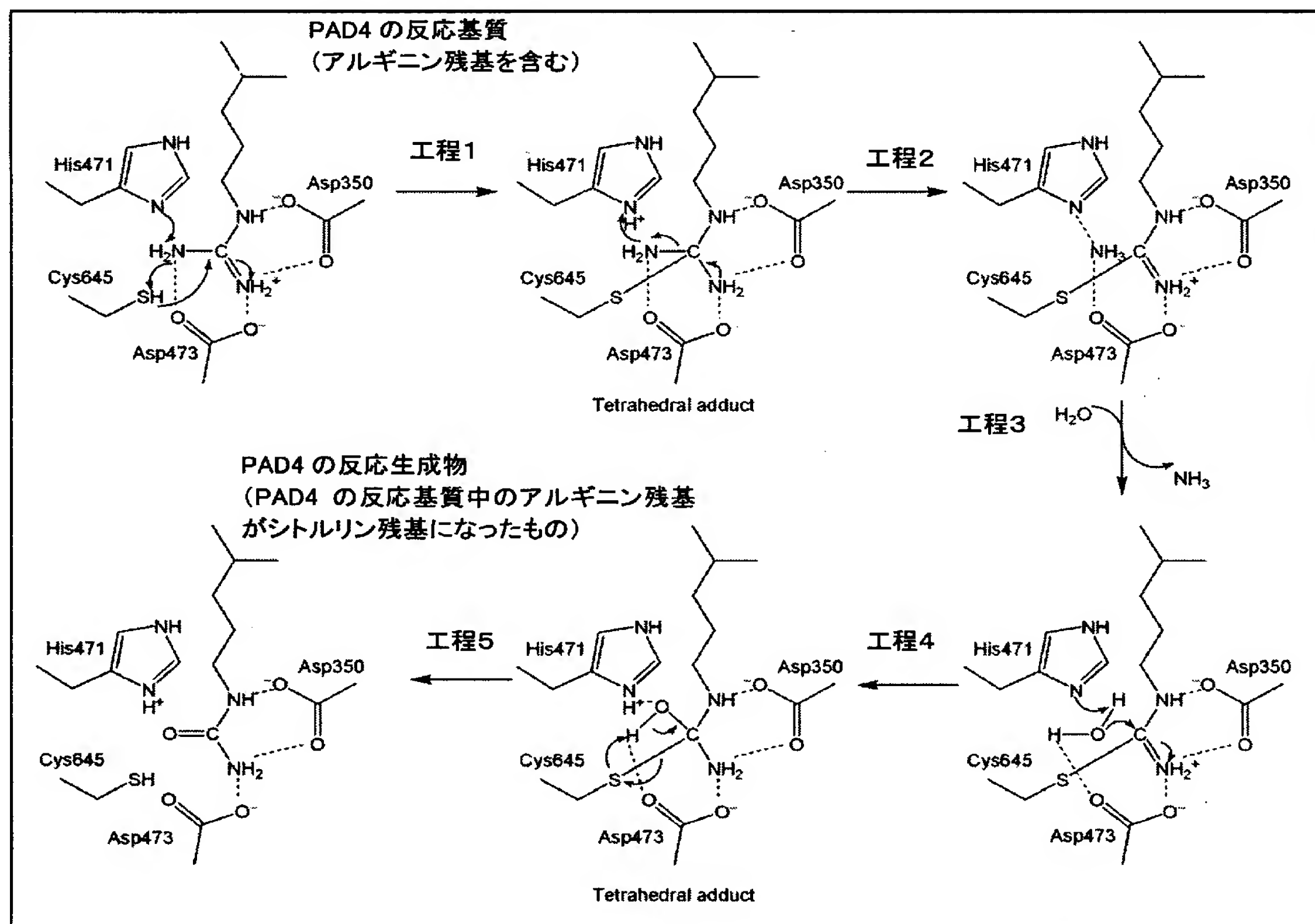
、酢酸塩、フマル酸塩などを挙げることができる。

一般式(I)で表される化合物およびその塩は、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤として利用することができる。

2. ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4 (PAD4) 阻害剤

本発明は、下記のスキームで表される、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質を有効成分として含有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤を提供する。

[0045] [化19]



(スキーム中、Asp350, His471, Asp473及びCys645は、それぞれ、配列番号1のアミノ酸配列における350位のアスパラギン酸残基、471位のアスパラギン酸残基、473位のアスパラギン酸残基及び645位のシステイン残基を表す)

配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質として

は、アルギニン誘導体等を挙げることができる。アルギニン誘導体としては、アルギニンのアミノ基およびグアニジノ基が置換基を有し、アルギニンのカルボキシル基が置換基を有してもよいアルギニン誘導体を挙げることができ、具体的には、一般式(I)で表される化合物およびその塩を例示することができる。

また、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質は、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4又はその変異体タンパク質の3次元構造座標の全部又は一部を利用して探索することができる。例えば、Protein Data Bankに登録されているCa²⁺-free PAD4の3次元構造座標(accession code 1WD8)又はそれからの根平均二乗偏差が、結合長について0.019オングストロームであり、結合角について1.894°である座標の全部又は一部、Ca²⁺-bound PAD4(C645A)の3次元構造座標(accession code 1WD9)又はそれからの根平均二乗偏差が、結合長について0.017オングストロームであり、結合角について1.662°である座標の全部又は一部、あるいはPAD4(C645A)・カルシウムイオン・基質(benzoyl-L-arginine-amide:BA)の複合体の3次元構造座標(accession code 1WDA)又はそれからの根平均二乗偏差が、結合長について0.014オングストロームであり、結合角について1.595°である座標の全部又は一部を利用して、コンピュータにより、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4に認識される物質を探索(例えば、同定、検索、評価又は設計)し、次いで、その物質の適当な位置に適当な種類の原子又は原子団を付加又は置換することにより、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4に認識される物質とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質を設計することができる。物質の探索に用いるコンピュータは特に限定されるものではなく、物質探索のためのプログラムが動作するものであればよい。プログラムとしては、DOCK(Science, 1992, 257, 1078)、Gold4、Glide、FlexX(J.Mol. Biol., 1996, 261, 470)、AutoDock(J. Comput. Chem., 1998, 19, 1639)、ICM(J. Comput. Chem., 1994, 15, 488)、Ludiなどを例示することができる。

工程1〜5のいずれかあるいはすべてを阻害する物質を設計するには、アルギニン

の =NH_2^+ 基の水素原子及び／又は -NH_2 基の水素原子をアルキル基(例えば、メチル基やエチル基など)に置換、及び／又は -NH- を $\text{-CH}_2\text{-}$ に置換するとよい。

配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質は、天然物又は合成品のいずれであってもよく、高分子化合物又は低分子化合物のいずれであってもよい。

配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質は、その物質の種類に応じて、公知の手法で製造するとよい。

次いで、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質とペプチジルアルギニンデイミナーゼ4との相互作用(例えば、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4に対する解離定数)、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質の存在下でのペプチジルアルギニンデイミナーゼ4の酵素活性を調べるとよい。ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4は公知の方法(例えば、The Journal of Biological Chemistry, Vol.277, No.51, pp.49562-49568, 2002 及びその中に引用された論文に記載の方法)で調製することができる。ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4に対する解離定数は、BIACORE3000 (Pharmacia Biosensor AB)を用いた表面プラズモン共鳴実験によって測定することができる。簡単に説明すると、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4をセンサーチップの表面に固定した後、被験物質をセンサーチップ上に注ぎ、平衡状態に達した後、スキッチャードプロットによって解離定数を測定する。ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4の酵素活性は Nakashima, K., Hagiwara, T., Ishigami, A., Nagata, S., Asaga, H., Kuramoto, M., Senshu, T. and Yamada, M. (1999) Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$. J. Biol. Chem., 274, 27786-27792に記載の方法で測定することができる。ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4の酵素活性を低下させる物質は、ペプチジルアルギニン

デイミナーゼ4阻害剤として利用することができる。

本発明のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤は、医薬品として、ヒト、その他の動物に投与してもよいし、実験用の試薬として用いてもよい。本発明のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤は、単独で使用してもよいし、あるいは他の薬剤（例えば、他の関節リウマチ予防・治療薬）と組み合わせて使用してもよい。

本発明のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤をヒトに投与する場合には、例えば、有効成分の量に換算して、1日あたり約0.1〜9000 mg/kg（体重）、好ましくは1日あたり約1〜900 mg/kg（体重）の投与量で、1回または数回に分けて経口投与するとよいが、その投与量や投与回数は、症状、年齢、投与方法などにより適宜変更しうる。

本発明のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの製剤にして、経口投与してもよいし、注射剤、坐剤などの製剤にして、腹腔内や静脈内への注射により非経口投与することもできる。製剤中の有効成分の含有率は、1〜90重量%の間で変動させることができる。例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの形態をとる場合には、有効成分を5〜80重量%含有させるのが好ましい。シロップ剤などの液剤の場合には、有効成分を1〜30重量%含有させるのが好ましい。さらに、非経口投与する注射剤の場合には、有効成分を1〜10重量%含有させるのが好ましい。

本発明のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤の製剤化は、賦形剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトールなどの糖類、バレイショ、コムギ、トウモロコシなどのデンプン、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機物、結晶セルロースなど）、結合剤（デンプンのり液、アラビアゴム、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、水素添加植物油、マクロゴール、シリコーン油）、崩壊剤（デンプン、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、CMC・Na、CMC・Ca、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウムなど）、矯味矯臭剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール、芳香性精油類など）、溶剤（注射用水、滅菌精製水、ゴマ油、ダイズ油、トウモロコシ

油、オリーブ油、綿実油など)、安定剤(窒素、二酸化炭素などの不活性ガス、EDTA、チオグリコール酸などのキレート剤、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、L-アスコルビン酸、ロンガリットなどの還元物質など)、保存剤(パラオキシ安息香酸エステル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェノール、塩化ベンザルコニウムなど)、界面活性剤(水素添加ヒマシ油、ポリソルベート80、20など)、緩衝剤(クエン酸、酢酸、リン酸のナトリウム塩、ホウ酸など)、希釈剤などの製剤添加物を用いて、公知の方法で行われる。

本発明のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤は、ペプチジルアルギニンデイミナーゼが関与する疾患を予防および／または治療するために利用することができる。ペプチジルアルギニンデイミナーゼが関与する疾患としては、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症などが知られているが、本発明のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤は、関節リウマチ、多発性硬化症などの予防および／または治療に効果的である。また、本発明のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤は、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4の研究に利用することができる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2004-28467号明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

- [0046] 本発明により、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤が提供された。この阻害剤を利用することにより、ペプチジルアルギニンデイミナーゼが関与する疾患(例えば、関節リウマチ、多発性硬化症など)を予防および／または治療することができる。

図面の簡単な説明

- [0047] [図1]本発明者らが提唱するPAD4の脱イミノ化反応機構。
[図2]製造例における最終精製品のHPLCチャート。1はBz-Arg, 2はBz-Arg(mono-methyl), 3はBz-ADMA, 4はBz-SDMAのピークである。
[図3]製造例で製造したBz-Arg誘導体のPAD4消化における阻害反応(反応時間40分)の結果を示す。
[図4]製造例で製造したBz-Arg誘導体のPAD4消化における阻害反応(反応時間60分)の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0048] 以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

[0049] [製造例] Bz-Arg誘導体の合成

Arg誘導体 (Arg:ナカライテスク(京都)、シトルリン:Sigma (St louis, USA)、N^G-Monomethyl-L-arginine:和光純薬(大阪)、ADMA (N^G,N^G-Dimethyl-L-Arginine):ALEXIS Biochemicals (Lausen, Switzerland)、SDMA (N^G,N^G-Dimethyl-L-Arginine):ALEXIS Biochemicals (Lausen, Switzerland))(10 μmol)を0.1 M NaHCO₃ (200 μl)に溶解し、Bz O₂ (10 μmol)/DMF(200 μl)を加えて攪拌後、室温で1時間放置した。反応液に水(200 μl)を加えて希釈後、酢酸エチル(500 μl)で3回洗浄した。得られた水溶液に6 M HCl(100 μl)を加え、酢酸エチル(500 μl)で4回洗浄した。次に、逆相HPLCを用いて、得られた反応溶液から目的Bz-Arg誘導体(1. Bz-Arg, 2. Bz-Arg(mono-methyl), 3. Bz-ADMA, 4. Bz-SDMA)を精製した。いずれのBz-Arg誘導体も精製後の収率は40%程度であった。

HPLC 条件

Waters M600 multi-solvent delivery system

UV: 220 nm

カラム:Develosil ODS-UG-5 (4.6 x 150 mm)

Temp: 30度

溶媒:0.05%TFA水溶液中、5%アセトニトリルから1%/minでアセトニトリル濃度を上昇させた。

最終精製品のHPLCチャートを図2に示す。図2の1はBz-Arg, 2はBz-Arg(mono-methyl), 3はBz-ADMA, 4はBz-SDMAのピークである。

化合物の同定はMALDI-TOFMS(質量分析)により行った。

装置 Applied Biosystems Voyager System 6178

[0050] [表1]

原子	精密質量数		
C	12		
H	1.00783		
N	14.0031		
O	15.9949		
			MALDI-TOF Mass
	精密質量数(M)	計算値 M+H	実測値M+H
Bz-Arg	278.1	279.1	279.5
Bz-Arg(monoMe)	292.2	293.2	293.6
Bz-ADMA	306.2	307.2	307.6
Bz-SDMA	306.2	307.2	307.6
Bz-citrulline	279.1	280.1	280.3

[試験例] Bz-Arg誘導体のPAD4消化における阻害反応

緩衝液B (0.1 M Tris/HCl, 10 mM CaCl₂, 2 mM DTT, pH7.6, 125 μl)、Bz-Arg (0.1 M Tris/HCl, 10 mM CaCl₂, pH7.6, 25 μl (濃度1nmol/μlのものから))、PAD4 (1 μl)を氷冷下で混合した。PAD4は、The Journal of Biological Chemistry, Vol.277, No.51, pp.49562-49568, 2002及びその中に引用された論文に記載の方法に従って調製した。Bz-Arg(mono-methyl), Bz-ADMA, Bz-SDMA, 緩衝液A (0.1 M Tris/HCl, 10 mM CaCl₂, pH7.6)をそれぞれ20 μl取り(濃度1nmol/μlのものから)、上記Bz-Arg溶液(30 μl)と混合し、37度で40分あるいは60分反応させた。1 M HCl (50 μl)を加えて反応を停止後、逆相HPLCで反応混合物を分離した。結果、Bz-ADMAが最も阻害作用が強く、次にBz-Arg(mono-methyl)が強かった。また、今回使用した濃度ではBz-SDMAには阻害作用は認められなかった。反応時間40分の結果を図3に、反応時間60分の結果を図4に示す。図3および4において、1は阻害剤なし、2はBz-Arg(mono-methyl)、3はBz-ADMA、4はBz-SDMAの結果である。また、縦軸は試料番号を、横軸はデイミノ化反応収率(Bz-citrullineの生成収率)を示す。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

- [0051] 本発明により、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤が提供される。この阻害剤を利用することにより、ペプチジルアルギニンデイミナーゼが関与する疾患(例えば、関節リウマチ、多発性硬化症など)を予防および／または治療することができる。

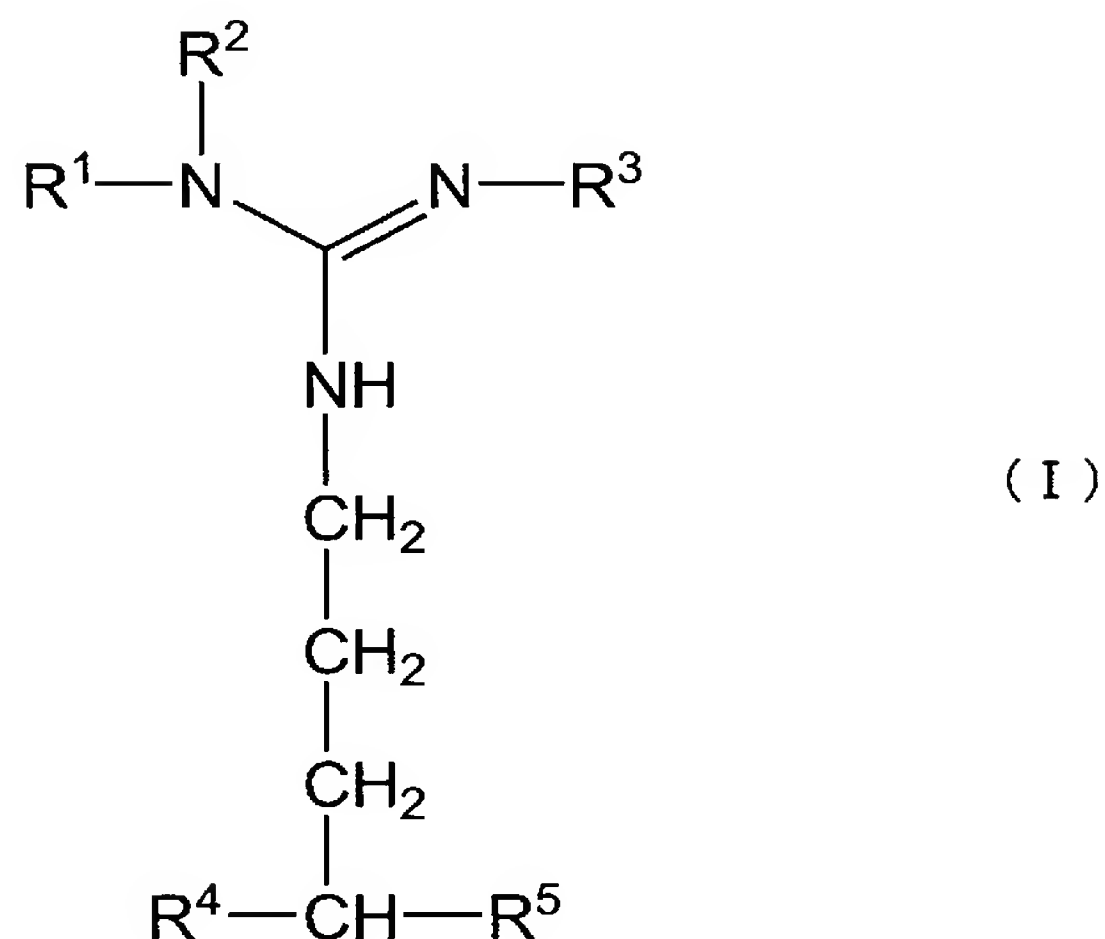
配列表フリーテキスト

[0052] 配列番号1は、ヒトペプチジルアルギニンデイミナーゼ4のアミノ酸配列を示す。

請求の範囲

[1] 下記的一般式(I)で表される化合物またはその塩。

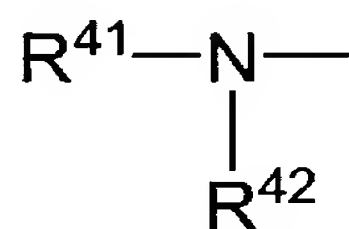
[化1]



(式中、 R^1 、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、水素原子または炭素数1〜3のアルキル基であるが、ただし、 R^1 、 R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つは水素原子ではなく、 R^4 は置換基を有するアミノ基であり、 R^5 は置換基を有してもよいカルボキシル基である)

[2] R^4 が、下記の式

[化2]

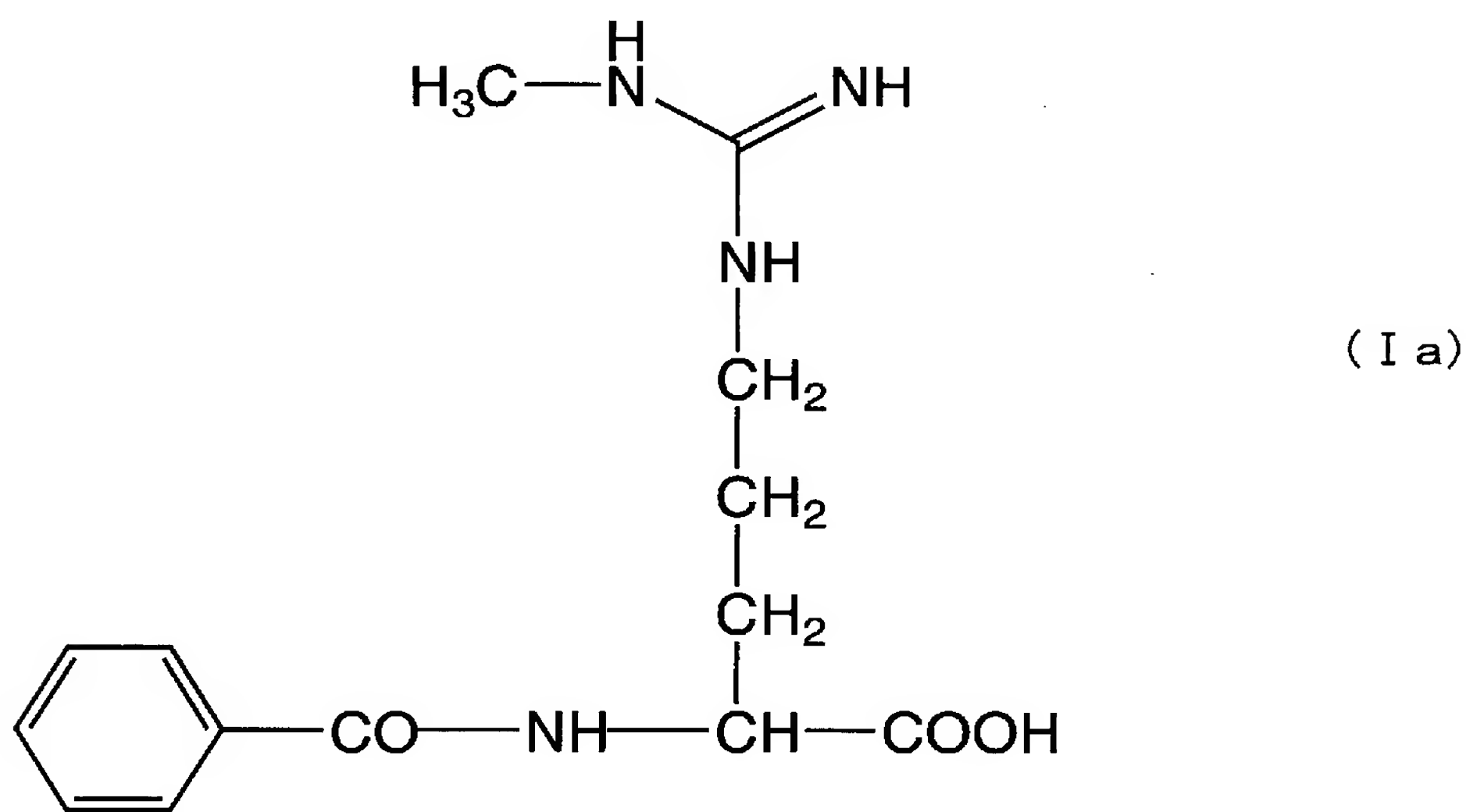


(式中、 R^{41} は、 $\text{R}^{401}\text{CO}-$ 〔式中、 R^{401} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基である〕で表される基、 $\text{R}^{402}\text{S}(\text{O})_m-$ 〔式中、 R^{402} は、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 m は1または2の整数である〕で表される基、 $\text{R}^{405}\text{N}(\text{R}^{406})-\text{CHR}^{404}-\text{CO}-[\text{NH}-\text{CHR}^{403}-\text{CO}]_n-$ 〔式中、 R^{403} 、 R^{404} 、 R^{405} および R^{406} は、それぞれ独立に、水素原子、置換基を有してもよい炭化水素基または置換基を有してもよい複素環基であり、 n は1〜50のいずれかの整数である〕で表される基または置換基を有してもよいペプ

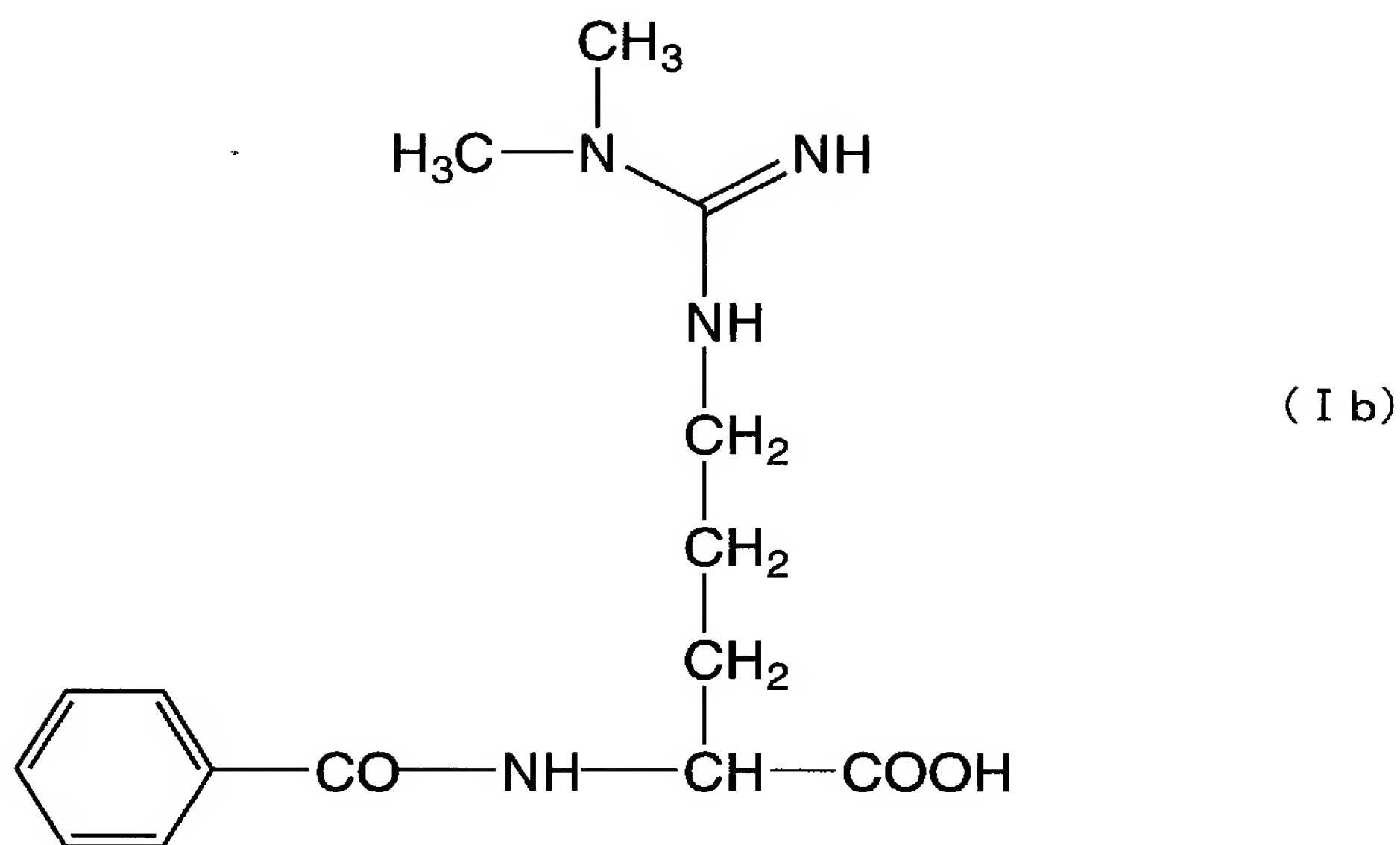
チジル基、 R^{42} は水素原子または炭素数1〜3のアルキル基である)で表される基である請求項1記載の化合物またはその塩。

- [3] R^{41} が、置換基を有してもよいベンゾイル基、置換基を有してもよいベンゾイルペプチジル基、置換基を有してもよいダンシル基または置換基を有してもよいダンシルペプチジル基であり、 R^{42} が水素原子である請求項2記載の化合物またはその塩。
- [4] R^1 、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、水素原子またはメチル基であるが、ただし、 R^1 、 R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つはメチル基である請求項1〜3のいずれかに記載の化合物またはその塩。
- [5] 下記の(Ia)、(Ib)または(Ic)で表される化合物またはその塩である請求項4記載の化合物またはその塩。

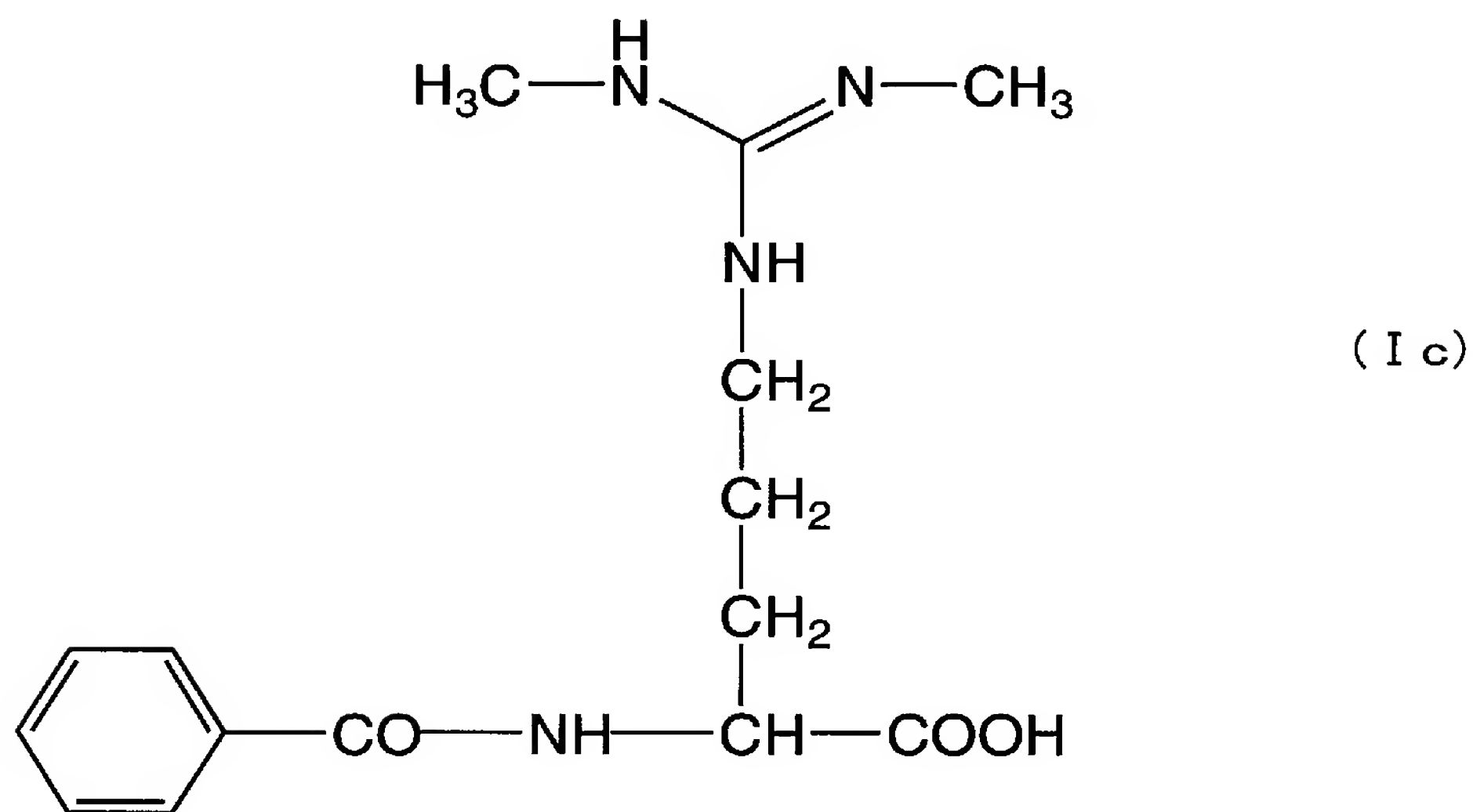
[化3]



[化4]

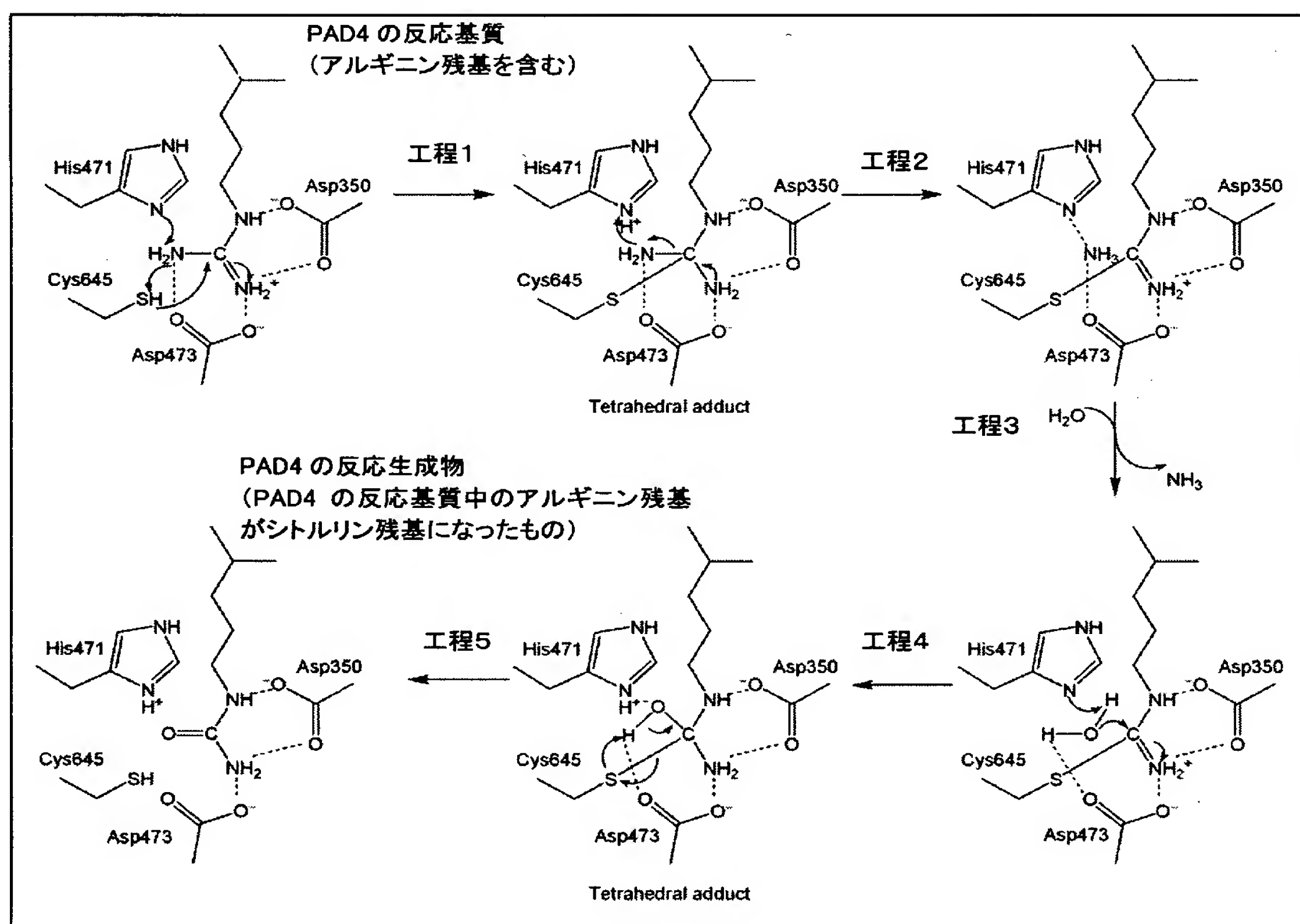


[化5]



- [6] 下記のスキームで表される、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質を有効成分として含有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。

[化6]

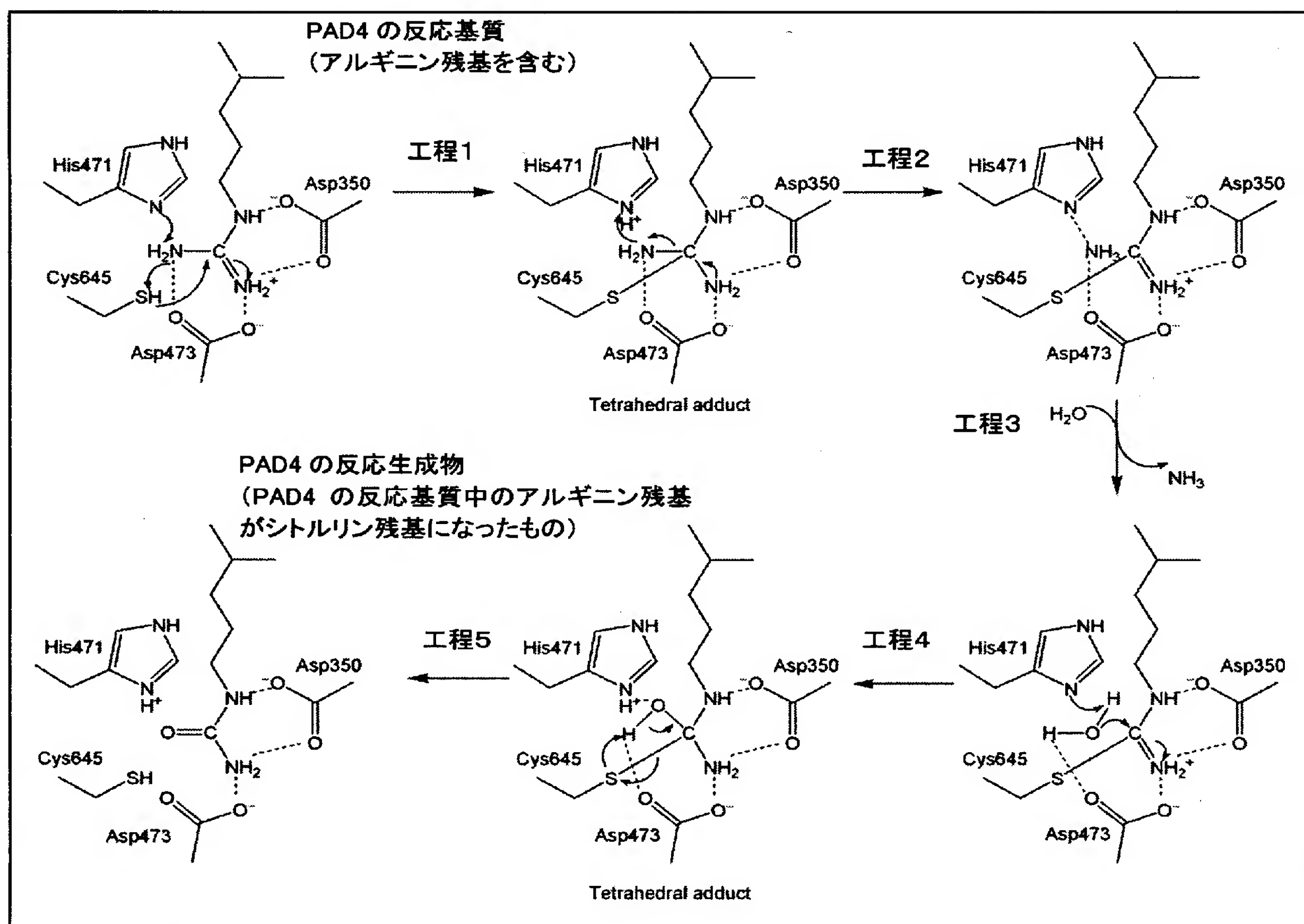


(スキーム中、Asp350, His471, Asp473及びCys645は、それぞれ、配列番号1のアミノ酸配列における350位のアスパラギン酸残基、471位のアスチジン残基、473位のアスパラギン酸残基及び645位のシステイン残基を表す)

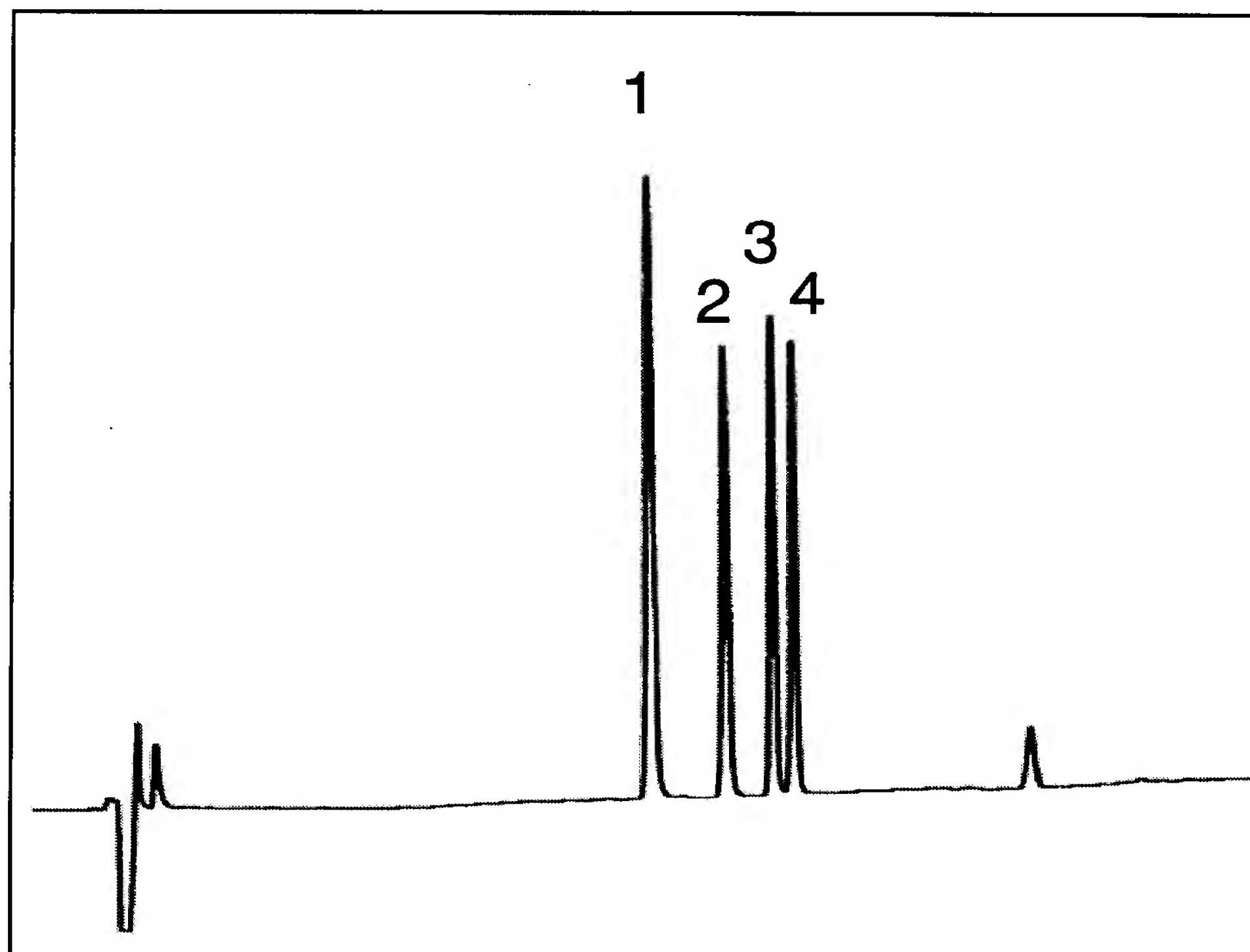
- [7] 配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1〜5のいずれかを阻害することができる物質がアルギニン誘導体である請求項6記載のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。
- [8] アルギニンのアミノ基およびグアニジノ基が置換基を有し、アルギニンのカルボキシル基が置換基を有してもよいアルギニン誘導体を有効成分として含有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。
- [9] アルギニン誘導体が請求項1〜5のいずれかに記載の化合物またはその塩である請求項7または8記載のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。
- [10] ペプチジルアルギニンデイミナーゼが関与する疾患を予防および／または治療するために用いられる請求項6〜9のいずれかに記載のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。

- [11] ペプチジルアルギニンデイミナーゼが関与する疾患が関節リウマチ、乾癬及び多発性硬化症からなる群より選択される請求項10記載のペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤。

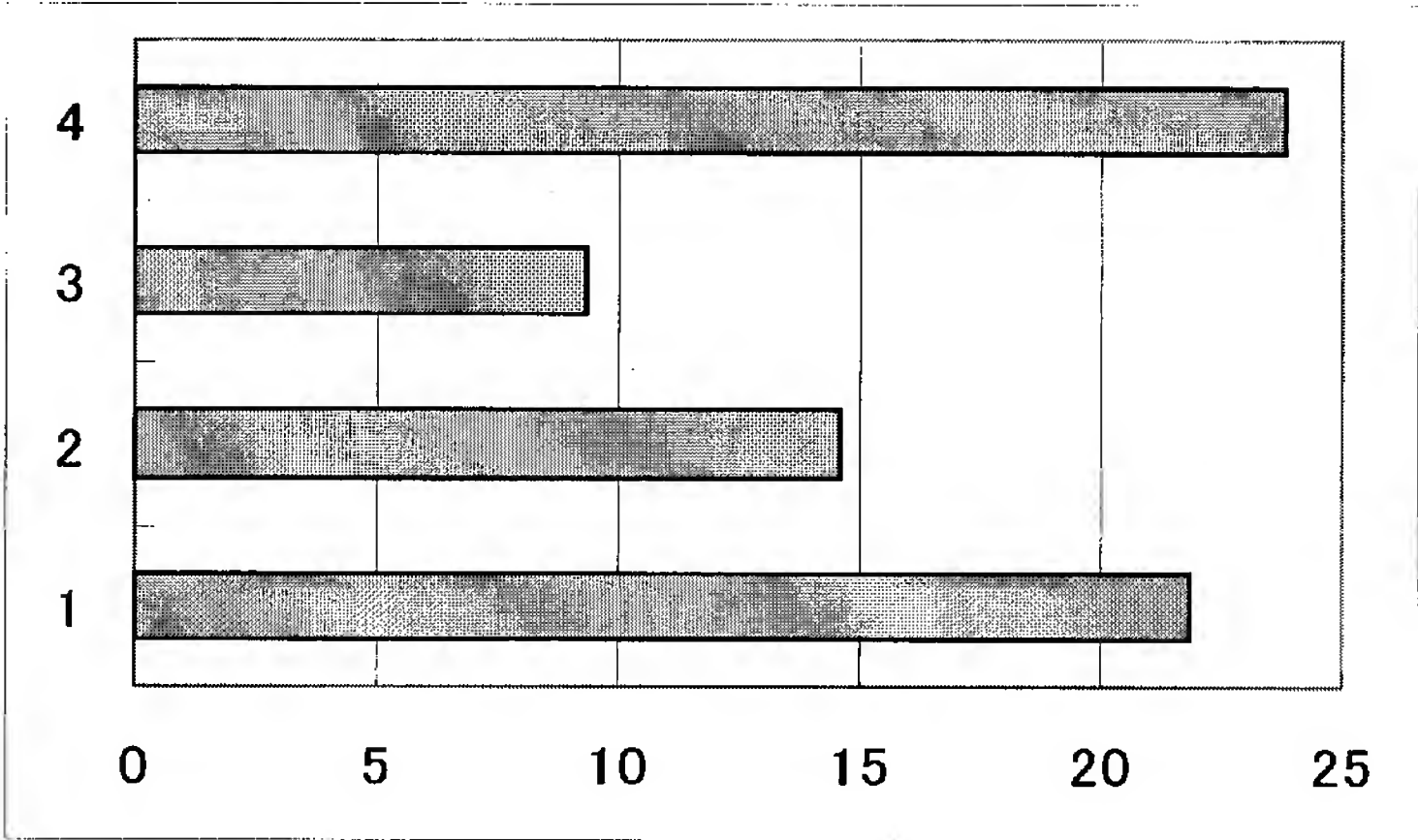
[図1]



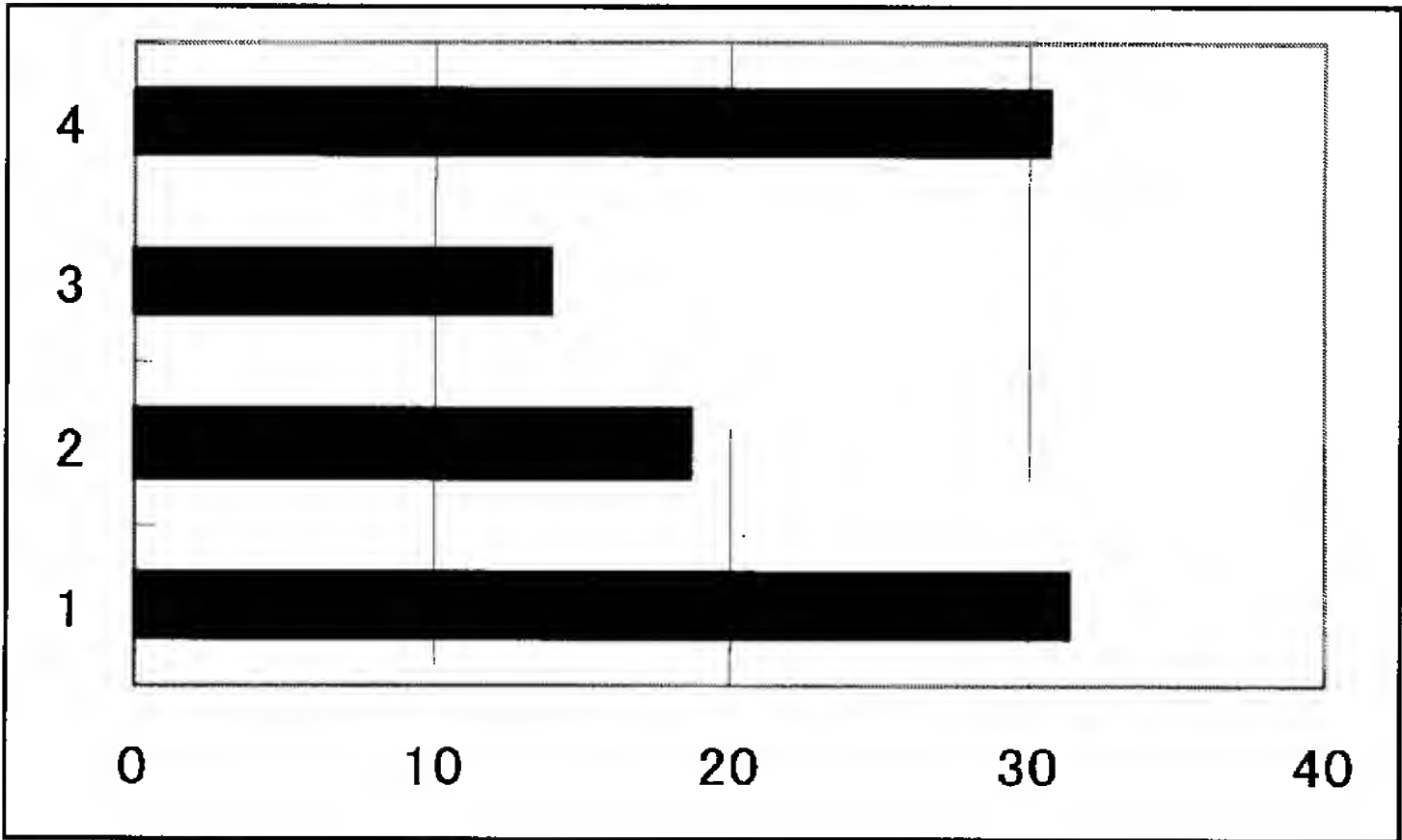
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07C279/14, A61K31/198, 45/00, A61P19/02, 29/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07C279/14, A61K31/198, 45/00, A61P19/02, 29/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	SASAKA Kei et al., 'N-Acetyl Conjugates of Basic Amino Acids Newly Identified in Rat Urine', Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol.219, No.2, pages 454 to 458, 1982	1, 2, 4 3, 5-11
X A	OGAWA Tadashi et al., 'Metabolism of N ^G , N ^G -and N ^G , N ^G -Dimethylarginine in Rats', Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol.252, No.2, pages 526 to 537, 1987	1, 2, 4 3, 5-11
X A	CHIKUMA Toshiyuki et al., 'A Highly Sensitive High-Performance Liquid Chromatography-Fluorometric Method for the Assay of Peptidylarginine Deiminase Activity', Analytical Biochemistry, Vol.285, pages 230 to 234, 2000	6, 7 1-5, 8-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 May, 2005 (30.05.05)

Date of mailing of the international search report

14 June, 2005 (14.06.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001574

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 99/11667 A1 (INNOGENETICS N.V.), 11 March, 1999 (11.03.99), Claims & EP 944649 A1 & US 2002/165355 A1	1, 2, 6-11 3-5
X A	JP 04-297497 A (Syntex (U.S.A.) Inc.), 21 October, 1992 (21.10.92), Claims & EP 472220 A1	1, 2, 6-11 3-5
P, X A	KYLE P.K. et al., 'Synthesis of cyclic and acyclic N α -methyl-N ω -alkyl-L-arginine analogues', Tetrahedron Letters, Vol.45, pages 2151 to 2153, 2004	1, 4 2, 3, 5-11
P, X A	SOTIR Zahariev et al., 'Solvent-free synthesis ofazole carboximidamides', Tetrahedron Letters, Vol.45, pages 9423 to 9426, 2004	1, 2, 4 3, 5-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001574

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001574

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claims 1-11 of this international application disclose four inventions differing in special technical feature as shown below.

(1) A compound which is an arginine derivative represented by the general formula (I) wherein R^4 is represented by [Chemical formula 2] or a salt of the compound (claims 1, 2, and 3)

(2) A compound which is an arginine derivative represented by the general formula (I) wherein R^1 , R^2 , and R^3 each independently is hydrogen or methyl (provided that at least one of R^1 , R^2 , and R^3 is not hydrogen) or a salt of the compound (claims 4 and 5)

(3) A peptidyl arginine deiminase type IV inhibitor which contains as an active ingredient a substance capable of inhibiting any of the steps 1 to 5 in the mechanism of the reaction of a peptidyl arginine deiminase type IV having an amino acid sequence of sequence number 1 with a substrate (claims 6 and 7, that part of claim 9 which depends only on claim 7, and that part of claims 10 and 11 which depends only on claims 6 and 7)

(4) A peptidyl arginine deiminase type IV inhibitor containing an arginine derivative as an active ingredient (claim 8, that part of claim 9 which depends only on claim 8, and that part of claims 10 and 11 which depends only on claim 8)

On the other hand, an arginine derivative usable as a peptidyl arginine deiminase type IV inhibitor is known to persons skilled in the art (WO 99/11667 A1).

In view of this, the technical feature common to all of claims 1-5, i.e., "an arginine derivative in which R^1 , R^2 , and R^3 each independently represents hydrogen or alkyl (provided that at least one of R^1 , R^2 , and R^3 is not hydrogen)," cannot be regarded as a special technical feature (a technical feature clearly showing a contribution to the prior art). There is hence no technical relationship among claims 1-5 which involves a special technical feature.

Furthermore, it is obvious that there is no technical feature common to all of claims 1 and 6 to 11.

Therefore, there is no technical feature common to all of claims 1 to 11 and, hence, this international application does not comply with the requirement of unity of invention.

• With respect to subject matters for search

Claim 6 relates to a peptidyl arginine deiminase type IV inhibitor which contains as an active ingredient a substance defined by a desired property, i.e., "a substance capable of inhibiting any of the steps 1 to 5." Claim 6 involves all substances having such property. However, the substances which are disclosed in the meaning of Article 5 of the PCT are limited to an extremely small part of the substances claimed. The claim is considered to lack a support of the description in the meaning of Article 6 of the PCT.

(Continued to next sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001574

With respect to the term "a substance capable of inhibiting any of the steps 1 to 5," the range of substances having such property cannot be specified even when the technical common sense at the time of the filing of this application is taken into account. Consequently, claim 6 does not comply also with the requirement of clearness as provided for in Article 6 of the PCT.

Therefore, a search was made for a peptidyl arginine deiminase type IV inhibitor containing as an active ingredient the compound which is specifically disclosed in the description and specified in claim 7.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C07C279/14, A61K31/198, 45/00, A61P19/02, 29/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C07C279/14, A61K31/198, 45/00, A61P19/02, 29/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)、REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	SASAKA Kei et al. 'N-Acetyl Conjugates of Basic Amino Acids Newly Identified in Rat Urine' Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol.219, No.2, pp.454-458, 1982	1, 2, 4 3, 5-11
X A	OGAWA Tadashi et al. 'Metabolism of N ^ε , N ^ε -and N ^ε , N ^ε -Dimethylarginine in Rats' Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol.252, No.2, pp.526-537, 1987	1, 2, 4 3, 5-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.05.2005

国際調査報告の発送日

14.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安藤 達也

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

4H

3445

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	CHIKUMA Toshiyuki et al. 'A Highly Sensitive High-Performance Liquid Chromatography-Fluorometric Method for the Assay of Peptidylarginine Deiminase Activity' Analytical Biochemistry, Vol. 285, pp. 230-234, 2000	6, 7 1-5, 8-11
X A	WO 99/11667 A1 (INNOGENETICS N.V.) 1999.03.11 特許請求の範囲 & EP 944649 A1 & US 2002/165355 A1	1, 2, 6-11 3-5
X A	JP 04-297497 A (シンテツクス (ユー・エス・エイ) インコーポレイテッド) 1992.10.21 特許請求の範囲 & EP 472220 A1	1, 2, 6-11 3-5
P, X A	KYLE P. K. et al. 'Synthesis of cyclic and acyclic N α -methyl-N ω -alkyl-L-arginine analogues' Tetrahedron Letters, Vol. 45, pp. 2151-2153, 2004	1, 4 2, 3, 5-11
P, X A	SOTIR Zahariev et al. 'Solvent-free synthesis of azole carboximidamides' Tetrahedron Letters Vol. 45, pp. 9423-9426, 2004	1, 2, 4 3, 5-11

○第Ⅲ欄の続き

この国際出願の請求の範囲1-11には、以下に示すとおり特別な技術的特徴の異なる4の発明が記載されている。

- (1) 一般式(I)のアルギニン誘導体で R^4 が[化2]で表される化合物またはその塩(請求の範囲1, 2, 3)
- (2) 一般式(I)のアルギニン誘導体で R^1 、 R^2 および R^3 が、それぞれ独立に、水素原子またはメチル基である(R^1 、 R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つは水素原子ではない)化合物またはその塩(請求の範囲4, 5)
- (3) 配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4とその反応基質との反応機構における工程1~5のいずれかを阻害することができる物質を有効成分として含有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤(請求の範囲6, 7, 請求の範囲9のうち請求の範囲7のみ従属する部分, 請求の範囲10, 11のうち請求の範囲6, 7のみ従属する部分)
- (4) アルギニン誘導体を有効成分として含有するペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤(請求の範囲8, 請求の範囲9のうち請求の範囲8のみ従属する部分, 請求の範囲10, 11のうち請求の範囲8のみ従属する部分)

一方、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤として使用できるアルギニン誘導体は当業者に公知である(WO 99/11667 A1)。

とすると、請求の範囲1-5全体に共通する技術的特徴「 R^1 、 R^2 および R^3 が、それぞれ独立に、水素原子またはアルキル基である(R^1 、 R^2 および R^3 のうちの少なくとも1つは水素原子ではない)アルギニン誘導体」を特別な技術的特徴(先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴)ということはできず、請求の範囲1-5の発明の間には特別な技術的特徴を含む技術的關係がない。

さらに、請求の範囲1, 6-11全体に共通する技術的特徴が存在しないことも明らかである。

したがって、請求の範囲1-11全体に共通する技術的特徴は存在しないから、この国際出願は発明の単一性の要件を満たしていない。

○調査の対象について

請求の範囲6は、「工程1~5のいずれかを阻害することができる物質」という所望の性質により定義された物質を有効成分とするペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤に関するものである。そして、請求の範囲6は、そのような性質を有するあらゆる物質を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、請求された物質のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「工程1~5のいずれかを阻害することができる物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する物質の範囲を特定できないから、請求の範囲6は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、明細書に具体的に記載され、請求の範囲7に特定されている化合物を有効成分とするペプチジルアルギニンデイミナーゼ4阻害剤について行った。

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。